

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen

GENETISCH BEDINGTE MOSAIKBILDUNGEN BEI *EPHESTIA KÜHNIELLA**

Von

ALFRED KÜHN

Mit 30 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Januar 1960)

Bei einer Mutante von *Ephestia kühniella* treten regelmäßig in ungefähr 20% Tiere auf, die in ihrer *Flügelbeschuppung* Mosaikmerkmale zeigen. Diese Erscheinung wird monofaktoriell durch Mosaiktiere und normal aussehende Geschwister übertragen. Der Faktor, der in Heterozygoten mit einer bestimmten niederen Penetranz die Mosaikbildung hervorruft, wurde mit dem Symbol *Mo* („*Mosaik*“) bezeichnet (KÜHN u. WOYWOD 1946). Aus der phänomenologischen und genetischen Analyse der Mosaikbildungen wurde geschlossen, daß sie auf einer unregelmäßigen Chromosomenverteilung beruhen. Über die in jahrelanger Fortzucht des Mosaikstammes und beim Einkreuzen verschiedener, andere mutierte Gene führender Stämme erhobenen Befunde, aus denen sich mannigfaltige genetisch-entwicklungsphysiologische Probleme ergaben, soll hier berichtet werden.

1. Kreuzungen

Der Betrag von ungefähr 20% Mosaiktieren innerhalb des Stammes ist bei ♀♀ und ♂♂ innerhalb der Fehlergrenzen gleich (Tabelle 1). In Kreuzung mit anderen Stämmen beträgt in F_1 die Penetranz ungefähr 4%. Die Anzahlen der Mosaiks in F_2 und Rückkreuzungen entsprechen gut den Erwartungen aus P und F_1 . Der Stamm, in dem die Mutation auftrat, enthält den geschlechtsgekoppelten Faktor *dz* („*dunkles Zentralfeld*“ und Verschmälerrung des Symmetriefelds, KÜHN 1939). Die Kreuzungen (Tabelle 2) zeigen, daß *Mo* nicht im X-Chromosom lokalisiert ist; denn unter den F_1 -♀♀ treten, ebenso wie unter den ♂♂, Mosaiks auf. Die Kreuzungen lassen erkennen, daß *dz* für die Ausprägung der Mosaikbildung nicht nötig ist, und daß die eingekreuzten Faktoren *Us* („*Ungegliedertes Symmetriefeld*“ und verdunkeltes Umfeld, SCHWARTZ 1944, Abb. 21a₂, S. 16), *Hu* („*Helles Umfeld*“ und Verschmälerrung des Symmetriefelds, homozygot letal, SEEGER 1955) und *Sy* („*Symmetriefeld*“

Tabelle 1. Häufigkeit von Mosaiktieren in dem *Mo*-Stamm und in Kreuzungen mit +-Stämmen

	n	% Mosaiks (\pm m)
<i>Mo</i> -Stamm		
♀	1456	21,0 (\pm 1,0)
♂	1737	18,8 (\pm 0,9)
insgesamt	3193	19,7 (\pm 0,7)
F_1	5219	4,3 (\pm 0,3)
F_2	2512	7,9 (\pm 0,5) Erwartung = 7,1
R: $F_1 \times Mo$	982	12,4 (\pm 1,1) Erwartung = 12,0

* FRIEDRICH OEHLKERS zu seinem 70. Geburtstag in Verehrung und Freundschaft gewidmet.

verschmälern“, homozygot letal, KÜHN 1932) die *Mo*-Wirkung nicht beeinflussen. Dasselbe haben durch Nachzuchten aus F_2 gewonnene *Mo/Mo*-Zuchten mit *b/b* („black“ WHITING 1919, KÜHN u. HENKE 1929) und mit *ml/ml* („musterlos“, KÜHN 1939, 1956) ergeben, in denen ungefähr 17–22% Mosaiktierchen erschienen (unter 408 *b/b*; *Mo/Mo*-Faltern 17,2% phänotypisch *Mo*, unter 310 *ml/ml*; *Mo/Mo* 22,2% phänotypisch *Mo*).

Tabelle 2. Häufigkeit von Mosaiken in F_1 aus Kreuzungen ♀♀ $\frac{Mo}{Mo}$ dz mit ♂♂ aus verschiedenen, andere mutierte Gene enthaltenden Stämmen

Genotypen (alle $\frac{Mo}{+}$)	Mustertyp	n	% Mosaiks
I ♀ $\frac{b}{+} +$	wild	680	2,7
II ♂ $\frac{b}{+} \frac{dz}{+}$	wild	602	4,0
III ♀ $\frac{ml}{+} +$	wild	768	4,2
IV ♂ $\frac{ml}{+} \frac{dz}{+}$	wild	696	6,1
V ♀ $\frac{Us}{+} +$	<i>Us</i> intermediär	324	5,2
VI ♂ $\frac{Us}{+} \frac{dz}{+}$	<i>Us</i> intermediär	308	3,2
VII ♀ $\frac{Hu}{+} +$	<i>Hu</i>	144	5,6
VIII ♀ $\frac{+}{+} +$	wild	118	3,4
IX ♂ $\frac{Hu}{+} \frac{dz}{+}$	<i>Hu</i>	122	3,3
X ♂ $\frac{+}{+} \frac{dz}{+}$	wild	132	6,1
XI ♀ $\frac{Sy}{+} +$	<i>Sy</i>	130	4,6
XII ♀ $\frac{+}{+} +$	wild	142	1,4
XIII ♂ $\frac{Sy}{+} \frac{dz}{+}$	<i>Sy</i>	144	2,8
XIV ♂ $\frac{+}{+} \frac{dz}{+}$	wild	138	4,2

2. Vitalitätsverhältnisse

Die Vitalität eines Stammes, die sich in der Häufigkeit erfolgreicher Paarungen, in der Gelegegröße und in der „Aufwachsanzahl“ (dem Prozentsatz der schlüpfenden Raupen und der bis zum Falter sich entwickelnden Raupen) ausdrückt, ist in dem *Mo*-Stamm stark herabgesetzt, wie Vergleiche mit anderen Stämmen zeigen, deren Zuchten gleichzeitig liefen (Tabelle 3). Nur solche Zuchten können zum Vergleich herangezogen werden; denn die Vitalität der Inzuchtstämme schwankt in Abhängigkeit von inneren Faktoren und Außenbedingungen (GEISSEL 1936, SENGÜN 1939). Zum Teil beruht die niedere Vitalität in dem *Mo*-Stamm gewiß schon auf *dz*; aber Gelegegröße und Aufwachsanzahl sind doch gegenüber diesem Stamm noch weiter gesenkt (Tabelle 3).

Große Unterschiede in der Vitalität der einzelnen Zuchtgruppen

im *Mo*-Stamm werden durch den Phänotypus der Eltern bedingt (Tabelle 3). Wenn beide Eltern phänotypisch normal sind, ist die Anzahl der erfolglosen Paarungen am kleinsten, kaum größer als bei anderen, *Mo* nicht führenden Stämmen. Die Anzahl der Eier im Gelege der äußerlich normalen ♀♀ ist beinahe um die Hälfte größer als die von phän. *Mo*-♀♀. Wenn einer der Paarlinge phän. *Mo* ist, wird der Prozentsatz der Paarungen ohne Gelege sehr hoch. Ist es das ♀, so bleibt die Hälfte der Paarungen erfolglos, doch auch der phän. *Mo*-Charakter des ♂ ist von Einfluß auf den Paarungserfolg. Die Aufwachsanzahl wird am tiefsten herabgedrückt, wenn beide Eltern Mosaikmerkmale zeigen. Schlüpfen schon im günstigsten Fall

(Tabelle 3 phän. norm. \times phän. norm.) nur etwa $\frac{2}{3}$ der Eier, so bringt es von den Gelegen beider phän. *Mo*-Eltern kaum mehr als $\frac{1}{3}$ der Eier zu schlüpfenden Räupchen. Die Zahlen der Tabelle 3 zeigen, daß der Faktor *Mo* sich vor allem schon in der Embryonalentwicklung schädigend auswirkt. Die Mosaikmerkmale, die an den Faltern äußerlich bemerkt werden, sind fast nur in der Beschuppung der Flügel ausgeprägt oder wenigstens nur da leicht feststellbar. Sie lassen keinen

Tabelle 3. Vitalitätsverhältnisse im *dz-Mo*-Stamm, *dz*-Stamm und 2 eingekreuzten Stämmen. n_Z Anzahl der Zuchten

Phänotypus der Eltern	n_Z	Eier je Z	Raupen % Eier	Falter			% Paarungen ohne Gelege
				je Z	% Eier	% Raupen	
norm. ♀ \times norm. ♂	10	148,0	62,9	54,5	36,8	58,5	14,8 von 61
<i>Mo</i> ♀ \times norm. ♂	16	102,1	40,5	26,9	26,0	64,0	55,5 von 72
norm. ♀ \times <i>Mo</i> ♂	14	147,0	44,2	30,5	20,8	46,9	36,7 von 79
<i>Mo</i> ♀ \times <i>Mo</i> ♂	10	106,2	36,6	18,8	17,8	48,8	57,5 von 106
<i>dz/dz</i>	26	182,6	71,2	81,5	44,7	62,7	10,9 von 55
<i>b/b</i>	10	220,1	88,5	142,2	64,6	73,0	8,6 von 50
<i>ml/ml</i>	12	208,0	83,5	145,6	70,0	83,9	12,0 von 50

Schluß auf die Leistungsfähigkeit in der Fortpflanzung und Aufwachsanzahl zu. Daß harmlose Zeichnungsmerkmale, wie die von *Hu* und *Sy*, Letalfaktoren anzeigen, die sich homozygot in der Embryonalentwicklung auswirken (SEEGER 1955), läßt vermuten, daß mosaikhaft ausgebildeten Abänderungen der Beschuppung auch *polyphän* letale Wirkungen zugeordnet sein können, die Mosaikerscheinungen in inneren Organen, auch in der Keimbahn, oder in dem allgemeinen Stoffumsatz betreffen. Aber außerdem können auch äußerlich gar nicht sichtbare verhängnisvolle Mosaikbildungen in der Keimbahn, in der Embryonalentwicklung oder in späteren Stadien wirksam werden.

Die Einkreuzung anderer Stämme (Tabelle 3) hebt die Anzahl der aus einer Paarung hervorgehenden Falter, aber nicht zu dem bei den *Mo*-freien Stämmen üblichen Betrag (F_1 mit dem *b*-Stamm je Zucht 91,6 bei einer Anzahl der Zuchten $n_Z = 7$; mit *ml* je Zucht 73,2 $n_Z = 10$; mit *Us* je Zucht 63,2 $n_Z = 5$; mit *Hu* je Zucht 86,0 $n_Z = 6$). Die Hebung beruht jedenfalls auf dem Ausgleich durch die Inzucht angesammelter vitalitätssenkender mutierter Gene; ihre Grenze wird einmal durch die bei den *Mo*-♀♀ verringerte Gelegegröße und wahrscheinlich auch durch mosaikhafte Störungen bedingt, welche die *Mo*-Eizellen einbringen.

Die Anzahl der Paarungen ohne Gelege und die Verringerung der Gelegegröße läßt sich z. T. auf *Veränderungen der Geschlechtsorgane von Mo*-♀♀ zurückführen. Diese waren immer symmetrisch, nie einseitig. Bei äußerlich normalen *Mo*-♀♀ sind häufig die Eischläuche kürzer und ärmer an ausgewachsenen, besamungsreifen Eiern als bei den ♀♀ anderer Stämme. Mit ganz wenigen beschalteten Eiern oder ganz verkümmert wurden die Ovarien bei einigen phän. *Mo*-♀♀ aus erfolgreichen Paarungen gefunden (Abb. 1b, c). Die sichtbare Entwicklungshemmung betrifft nur die Eischläuche. Die Ausführungsgänge und Anhangsorgane sind fast immer normal in Form und Größe ausgebildet. Nur bei einem Fall mit stark, aber

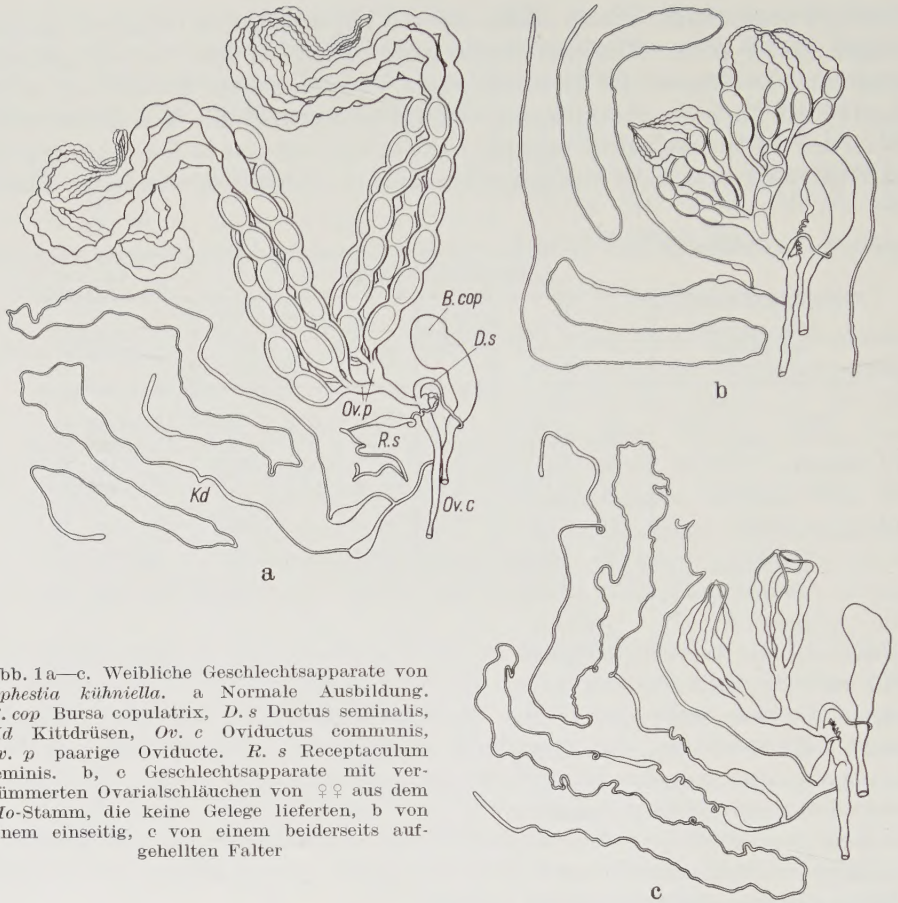


Abb. 1a—c. Weibliche Geschlechtsapparate von *Ephestia kühniella*. a Normale Ausbildung. *B. cop* Bursa copulatrix, *D. s* Ductus seminalis, *Kd* Kittdrüsen, *Ov. c* Oviductus communis, *Ov. p* paarige Oviducte. *R. s* Receptaculum seminis. b, c Geschlechtsapparate mit verkümmerten Ovarialschläuchen von ♀♀ aus dem *Mo*-Stamm, die keine Gelege lieferten, b von einem einseitig, c von einem beiderseits auf-gehellten Falter

nicht extrem reduzierten Ovarien (Abb. 1b) waren die Kittdrüsen-schläuche um etwa $\frac{1}{4}$ verkürzt und die Reservoirs der Kittdrüsen verkleinert.

3. Mosaikhafte Aufhellung der Schuppen

Weitaus die meisten Mosaikbildungen sind „*Halbseitenmosaiks*“, bei denen der Vorderflügel der einen Seite viel hellere Schuppen trägt als der der anderen Seite. Diese Erscheinung fiel als erste in dem *dz-Mo*-Stamm auf (Abb. 2); sie erscheint auch in Faltern mit Wildmuster (Abb. 3a) und mit schwarzer Beschuppung (Abb. 3b) aus F_2 , Rückkreuzungen und Nachzuchten aus F_2 .

Der Wechsel der Schuppenhelligkeit kann bei *Ephestia*-Rassen auf verschiedene Weise zustande kommen. Die Beschuppung der *Wildform* setzt sich aus verschiedenen pigmentierten Schuppen zusammen, die sich in einem *Farbtypen*-Schema anordnen lassen, das in mehreren Linien von blaßgrauen, kaum pigmentierten Schuppen zu den extremen Formen der dunklen (IV, VI) und hellen Zeichnungsschuppen (VII, VIII) führt (Abb. 4). Diese Schuppentypen unterscheiden sich nicht nur durch die Pigmenteinlagerung voneinander, sondern auch in ihrer Form und Struktur (KÜHN u. HENKE 1932; KÜHN 1941, 1946; KÜHN u.

AN 1946). Die mittlere Länge der einzelnen Farbtypen (Abb. 5) zeigt, wie sie an den übereinander gestaffelten *Schuppenschichten* (vgl. KÜHN u. HENKE 1932, Tafel VII, Abb. 4) teilnehmen. Bei dem *Wildstamm* setzt sich das *Zeichnungsmuster*, das die Schuppen der obersten Schuppenschicht, die Deckschuppen, bilden (Abb. 3a₂), vorwiegend aus den Farbtypen IV, V, VI, VII und VIII zusammen. Die Farbtypen II, III, z. T. auch V, stehen in der Schicht der Mittelschuppen; die Tiefenschuppen gehören dem Typus I an (Abb. 5). Bei verschiedenen *Ephestia-Mutanten* weicht das Muster von der Wildform dadurch ab, daß die Zusammensetzung der Typen in der Deckschicht wechselt.

In Abb. 6 ist wiedergegeben, welchen Anteil die Farbtypen an den Längsklassen im Zentralfeld von dz/dz ; Mo/Mo und bei b/b ; $Mo/$ haben.



Abb. 2a u. b. Die Vorderflügel eines Halbseiten-Helligkeits-Mosaiks aus dem *dz-Mo*-Stamm. ♂ dz/dz ; Mo/Mo . Linker Flügel mit normalem Muster, rechter Flügel aufgefellt. 8/1*



Abb. 3a u. b. Flügel von Halbseiten-Helligkeits-Mosaiks. a F_1 : $dz/+$; $Mo/+$; linker Flügel aufgefellt; b aus F_2 b/b ; $Mo/$., rechter Flügel aufgefellt. 6,5/1

* Alle Flügelzeichnungen verdanke ich Herrn ERICH FREIBERG

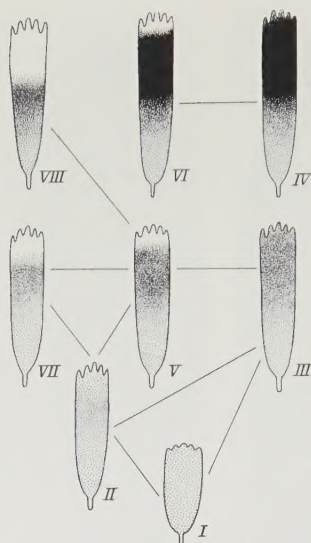


Abb. 4

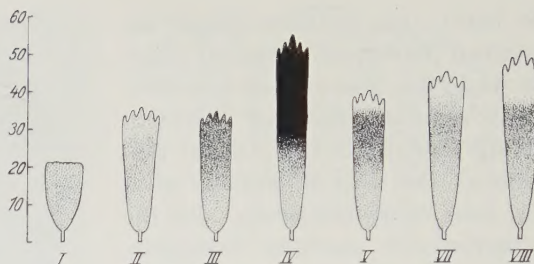


Abb. 5

Abb. 4. Schema der 8 Farbtypen von Schuppen der Vorderflügeloberseite. Ungefähr 65/1

Abb. 5. Vertreter der Farb- und Formtypen der Schuppen (soweit ihr Anteil an der Beschuppung 5 % überschreitet) der Vorderflügeloberseite eines wildfarbigen Stammes (4 Individuen) jeweils den Mittelwerten der Länge, der Breite und des Längenbreitenverhältnisses entsprechend. Anzahlen der Schuppentypen: I 1063, II 358, III 425, IV 395, V 557, VII 361, VIII 206. Ungefähr 65/1

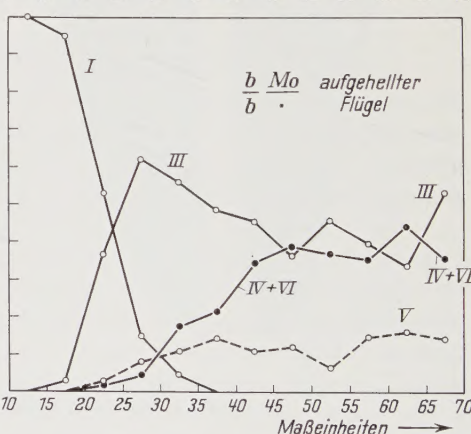
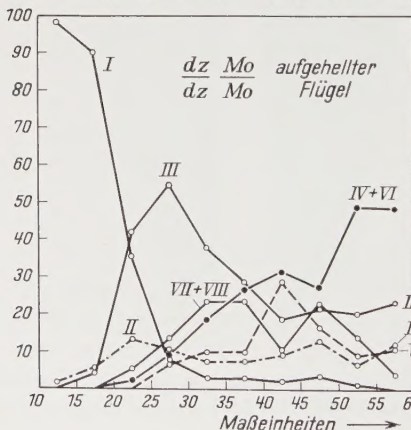
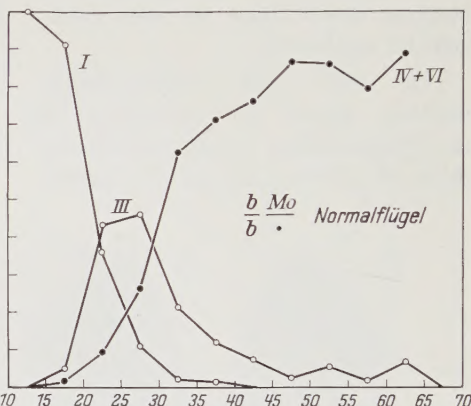
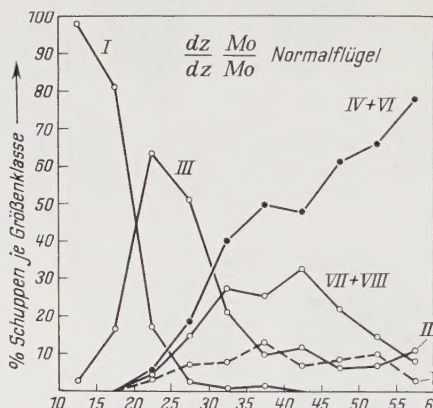


Abb. 6. Anteil der Schuppen der Farbtypen an der Besetzung der einzelnen Größenklassen (Schuppenlänge) bei Mosaikindividuen, Abklatsch aus dem Zentralfeld. Schuppenzahlen: $dz/dz; Mo/Mo$ Normalflügel 2954, aufgehellter Flügel 2861, $b/b; Mo/Mo$ aus F_2 Normalflügel 1798, aufgehellter Flügel 2923

Farbtypus I stellt immer die Tiefenschuppen, III mit dem Gipfel zwischen 20 und 30 Längenmaß-Einheiten (ME) den Hauptanteil der Mittelschuppen; Typen mit mehr als 35 ME reichen in die das Zeichnungsmuster bildende Decke. In den durch *Mo* aufgehellten Flügeln geht der Anteil der schwarzpigmentierten Schuppen in den hohen Längenklassen zurück: Die Mehrzahl der Deckschuppen sinkt zu niedrigeren Pigmentierungsstufen (III, V sogar II in Abb. 4) herab. Das Absinken von IV auf III und VI auf V ist besonders deutlich bei *b/b*, wenn man den Anteil der

Mittel- und Deckschuppen von bestimmten Farbtypen in der Flügelbeschuppung (ohne die Tiefenschuppen) überhaupt betrachtet (Tabelle 4). Bei dieser Aufhellung werden nicht andere Längen- und Form-Farbtypen an die Stelle der normalen gesetzt, sondern die *Pigmenteinlagerung in die ihrer Gestalt nach fertig gebildeten Schuppen bleibt gegenüber der Norm zurück*. Der Ausfärbungsverlauf während der Puppenzeit in den Tagen vor dem Schlüpfen des Falters (Abb. 7) ähnelt dem der Mutante *he* („gehemmte Ausfärbung“, KÜHN 1939): Die Pigmentierung des später helleren Flügels setzt etwas später ein, steigt dann ungefähr parallel mit dem dunkleren Flügel an, bleibt aber dann auf einer niedrigeren Stufe stehen, die bei den Mosaiks etwas höher liegt als bei *he*-Flügeln (vgl. KÜHN 1939, Abb. 19, 20).

Zur statistischen Aufnahme der Helligkeitsunterschiede der Falterflügel wurden 5 Flügel als Klassengrenzen ausgewählt, die in möglichst gleichabständigen Stufen von den hellsten zu den dunkelsten Ausprägungen hinüberführen. Bei gleichflügeligen Faltern (Abb. 8a) liegt das Maximum in Klasse 3 ($M \pm m = 3,51 \pm 0,01$). Bei Halbseitenmosaiks (Abb. 8b) ist die Kurve der aufgehellten Flügel stark nach der helleren Seite verschoben ($M \pm m = 2,41 \pm 0,05$). Bei 60% fallen sie in Klasse 1 und 2 der Helligkeitsskala, während von den beiderseits gleichhellen Tieren des Stammes nur 5,3% die Klasse 2 erreichen. Die Variantenverteilung der dunkleren Flügel der Halbseitenmosaiks stimmt auch nicht mit der der Gleichflügeligen überein; das Kurvenmaximum ist um eine Klasse zur dunkleren Seite hin verschoben, $M \pm m = 4,01 \pm 0,06$. Also steht bei einem Teil

Tabelle 4. Anteil der Farbtypen der Mittel- und Deckschuppen in % der Flügelbeschuppung ohne Typus I in einem schwarzschuppigen Stamm und bei einem Mosaik aus *F*₂

Farbtypus	<i>b/b</i> -Stamm	$\frac{b}{b} \frac{Mo}{b}$	
		Normalflügel	aufgehellter Flügel
II	5,6	6,1	7,9
III	30,4	26,4	58,1
IV	49,5	53,2	16,9
V	4,3	5,0	10,0
VI	4,8	5,5	2,4
VII u. VIII	5,4	3,8	4,7
n	726	1358	1684

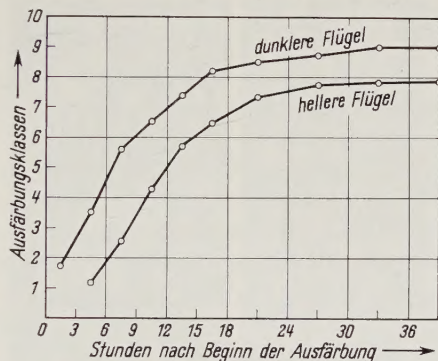


Abb. 7. Ausfärbungsverlauf der Flügel von Halbseiten-Helligkeits-Mosaiks im *dz-Mo*-Stamm in Zeitabständen von 3, später 6 Std vom Beginn der Ausfärbung an; Durchschnittswerte von 9 Individuen.

Ordinate: Ausfärbungsklassen (vgl. KÜHN 1939, Abb. 18)

der Mosaiktiere der Aufhellung der einen Seite eine Verdunkelung der anderen Seite gegenüber. Zwischen den Helligkeitswerten des helleren und dunkleren

Flügels desselben Falters besteht eine gesicherte Korrelation (Tabelle 5); und da die Variationskurven der Halbseitenmosaiks einander überschneiden, läßt sich zwar statistisch für

Tabelle 5. Korrelation zwischen der Flügelhelligkeit der beiden Flügel von Mosaikfaltern des dz-Mo-Stammes aus Kreuzungszuchten. Varianten in den 5 Helligkeitsklassen

	Hellere Flügel			
	1	2	3	4
Dunklere Flügel	3	44		
	4	54	29	
	5	10	29	10

$$n = 180; r \pm m_r = 0,63 \pm 0,05.$$

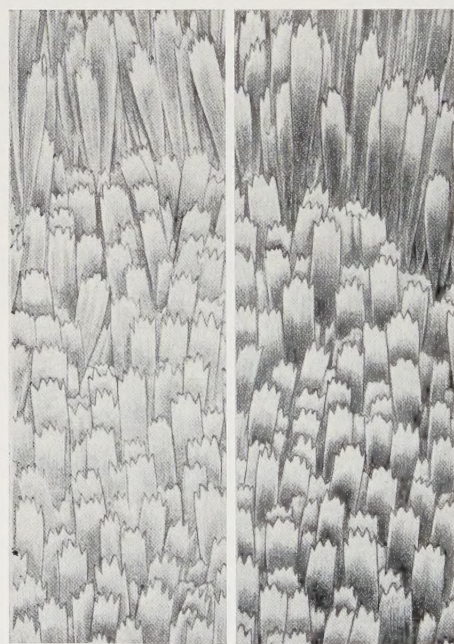
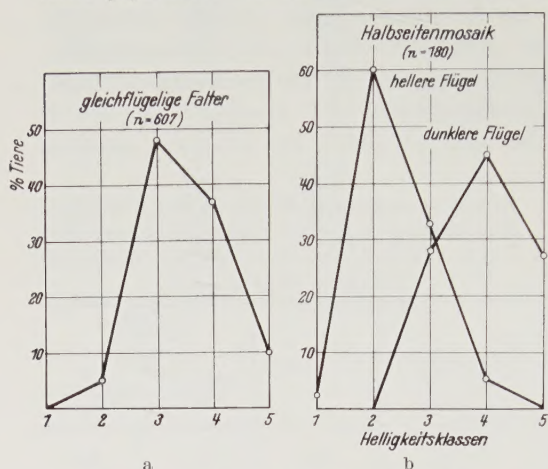


Abb. 9

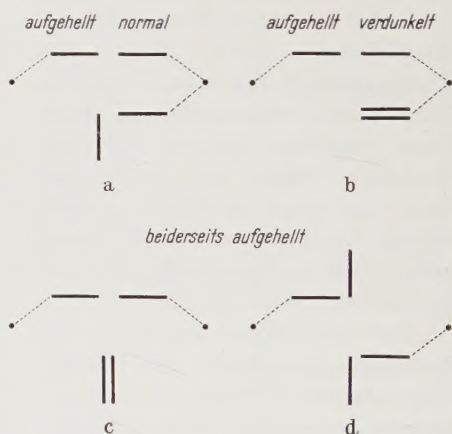


Abb. 10

Abb. 9. Einander entsprechende Stücke vom Außenrand der beiden Flügel eines $ml/ml; Mo/.$ — Helligkeitsmosaiks aus F_3 . 70/1

Abb. 10 a—d. Chromosomale Interpretation der Mosaikbildungen im Mo-Stamm

einen Teil der dunkleren Flügel aussagen, daß sie gegenüber der Norm verdunkelt sind; nicht aber läßt sich das mit Sicherheit für das einzelne Flügel-paar feststellen. Eine andere Erscheinung, die bei einigen Tieren auftrat ist aber

unmittelbar ablesbar: eine *beiderseitige Aufhellung*, wenn beide Flügel der Klasse I angehören, die von gleichflügeligen Faltern nie erreicht wird.

Bei dem Genotypus b/b ist die Aufhellung sehr auffällig (Abb. 3b₂), eine Vermehrung des Pigments auf der dunklen Seite ist nicht feststellbar, vielleicht ist sie in den schwarzen Schuppen überhaupt nicht möglich. Sehr deutlich sind Pigmentverminderung und -vermehrung aber bei ml/ml ; $Mo/-$ -Tieren. Bei ml werden in der gesamten Beschuppung nur die Farbtypen I, VII und VIII (vgl. Abb. 5) ausgebildet, als Tiefen-, Mittel- und Deckschuppen. Abb. 9 zeigt Flügelausschnitte von einem links aufgehellten, rechts verdunkelten ml -Tier. Der Formcharakter und auch die Struktur der typischen hellen Deckschuppen ist völlig gewahrt; aber auf der einen Seite ist das Pigment fast ganz verschwunden, auf der anderen ist das typisch auf den mittleren und basalen Teil der VIII-Schuppe beschränkte Pigment fast bis zu Schwarz vermehrt.

Diese häufigsten Mosaikerscheinungen bei der Mutante, halbseitige Pigmentmengenänderung in den Schuppen, lassen sich am einfachsten erklären durch eine frühembryonale *Elimination eines Chromosoms*, das ein Gen enthält, welches die Pigmenteinlagerung in die Schuppen beeinflusst und additiv wirkt; es sei mit Pm bezeichnet. Je nachdem, ob eine Spalthälfte eines Pm -Chromosoms verlorengeht (Abb. 10a) oder ob beide Spalthälften nach einem Pol abrücken (Abb. 10b), wird eine einseitige Aufhellung oder damit korrespondierend eine Verdunkelung der anderen Seite entstehen. Beiderseitige Aufhellung kann durch Verlust zweier Chromatiden (Abb. 10c, d) bewirkt werden.

4. Mosaikbildungen aus Heterozygoten

Auf die Interpretation, daß Chromosomenelimination die Mosaikbildung bewirkt, führt auch das mosaikhafte Herausspalten rezessiver Allele aus Heterozygoten.

Am häufigsten erscheint in $b/+$ -Tieren ein schwarzer Flügel (Abb. 11); es ist also auf der einen Seite b^+ verloren gegangen. Mit dem Hervortreten von b ist regelmäßig noch eine andere Erscheinung verknüpft: *alle Schuppen des b-Flügels sind stark verkleinert*. Abb. 12a zeigt die Schuppensdimensionen eines normalen b/b -Tieres. Von den Farbtypen stellt I die Tiefenschuppen, III die Mittelschuppen, IV die allgemeine Decke und VII und VIII das helle Zeichnungsmuster (die weiße Proximal- und Distalbinde). Auf dem b -Flügel des Mosaiks sind alle Typen wesentlich kürzer und schmaler (Abb. 12b); meist ist auch der ganze Flügel etwas kleiner als der wildfarbige (Abb. 11). Hieraus ist zu schließen, daß in dem Chromosom, in dem b^+ bzw. b lokalisiert ist, auch ein Faktor liegt, der auf die Schuppengröße wirkt, und zwar additiv. Dieser Schluß wird bestätigt durch das Verhalten der Schuppen auf der Seite mit dem normalen Muster: Hier sind die Schuppen entweder von normaler Größe, oder sie sind *stark vergrößert* (Abb. 12c, 13). Das erste entspricht dem Verlorengehen einer $+$ -Chromatide der b -Seite, das Zweite dem Abrücken beider $+$ -Chromatiden, im Sinne von a oder b des Schemas der Abb. 10. Ebenso wie die Schuppen sind auch die *Schuppenbälge* in dem für b monosomen Flügel verkleinert, in dem trisomen $b/+/+$ -Flügel vergrößert (Abb. 14). In jenem stehen sie auch wesentlich dichter als in dem Flügel mit den vergrößerten Schuppen. Es wird also nicht nur das Schuppenwachstum, bzw. die Größe der Schuppenbildungszellen abgeändert, sondern *die Monosomie oder die Trisomie*

bewirkt eine Veränderung des ganzen Epithelmosaiks, in dem die Schuppenbildungszellen determiniert werden.

Den 16 beobachteten $b/+$ -Halbseitenmosaiks stehen verhältnismäßig wenige Fälle von halbseitigem Herausspalten anderer bekannter rezessiver Allele gegenüber: 9 aus $ml/+$, 1 aus $he/+$ und 1 aus $wa/+$. Da die Gene b , ml und wa (KÜHN und SCHWARTZ 1942) nicht gekoppelt sind und mit deren Herausspalten eine Veränderung der Schuppenpigmentierung (Pm) nicht verknüpft sein muß, ist zu folgern,



Abb. 11a u. b. Linker und rechter Flügel eines Halbseitenmosaiks, im linken Flügel b herausgespalten. 6,5/1

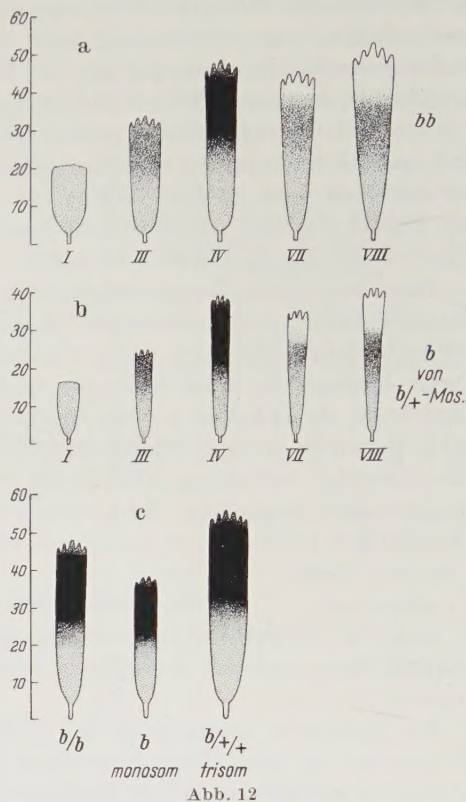
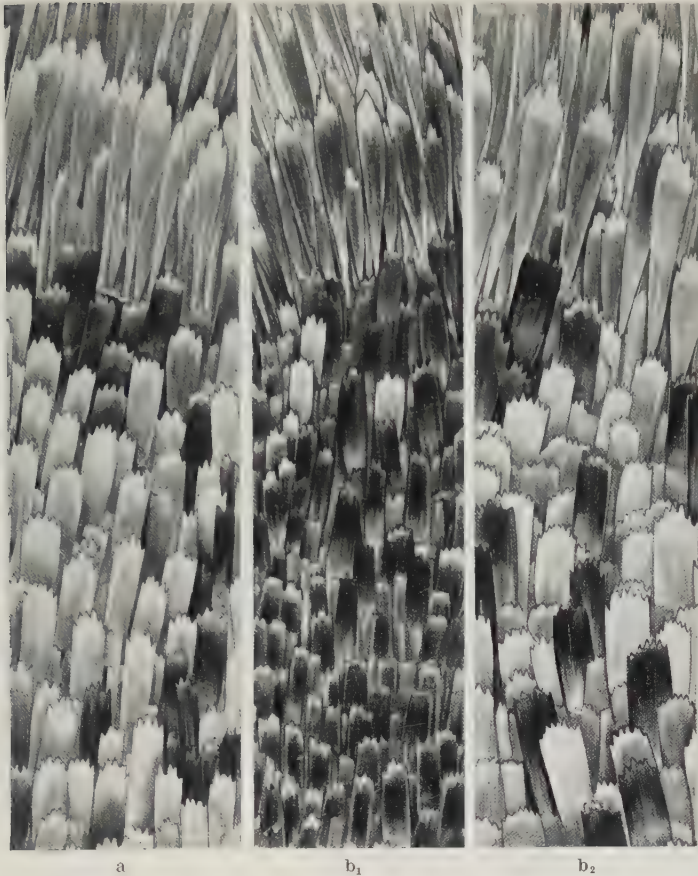


Abb. 12a—c. Vertreter der Farbtypen der Schuppen: Mittelwerte der Längen, Breiten, des Längenbreitenverhältnisses und des Verbreiterungsindex. a Schuppen eines schwarz-schuppigen Stammes, b des schwarz-schuppigen Flügels eines $b/+$ -Mosaiks (Abb. 11); Anzahlen der Schuppentypen: bb I 123, III 116, IV 230, VII 17, VIII 15, $b/+$ -Mos: I 102, III 104, IV 225, VII 22, VIII 18. c Vertreter der Schuppen des Farbtypus IV; jeweils Mittelwerte von 50 Schuppen von einem Tier des eingekreuzten b -Stammes, dem b -Flügel und aus den dunklen Zeichnungselementen des wildfarbigen Flügels eines Mosaiks aus F_1 $b/+$; $Mo/+$ (vgl. Abb. 13). Ungefähr 65/1

daß nicht nur das Chromosom, welches Mo enthält, eine unregelmäßige Verteilung erfahren kann, sondern daß verschiedene Chromosomen der durch Mo bewirkten Verteilungsanomalie unterworfen werden können.

Besonders aufschlußreich sind Fälle, in denen ml herausspaltet (Abb. 15). Die Bezirke mit nur hellen Zeichnungsschuppen (Farbtypus VII und VIII) heben sich nicht nur auf den Flügeln sondern auch an anderen Körperteilen von den normal beschuppten sehr deutlich ab. Abb. 15a zeigt ein $ml/+$ -Mosaik, in dem normale (dz) und ml -Bezirke nicht streng symmetrisch auf die Körperhälften verteilt sind: Der Kopf mit den Antennen, der dorsale Teil des Prothorax mit den den rechten Flügelansatz bedeckenden Schuppen



a

b₁b₂

Abb. 13a u. b. Ausschnitte aus dem Flügelaußenrandgebiet mit den proximalen Randfransen: a von einem Wildflügel, b₁ vom linken, b₂ vom rechten Flügel eines Mosaik-♀ aus F₁, b/+; Mo/+; b₁ schwarz-schuppig, Schuppen verkleinert, b₂ wildfarbig, Schuppen vergrößert. 70/1

(„Schulter-Schuppen“) und ein Teil des dorsalen Mesothorax sind normal dunkel beschuppt, dann folgt eine Anzahl von Segmenten, die in der Mittellinie in dunkle und helle geschieden sind; der Flügel und die Beine der rechten Seite sind *ml* gemäß weiß beschuppt. Diese Befunde und entsprechende an b/+ -Mosaiks zeigen, daß der „Halbseitigkeit“ der Flügelbeschuppung *nicht immer eine völlig symmetrische Aufteilung* aller Körperbezirke entspricht.



a

b

Abb. 14a u. b. Schuppenbälge auf einander entsprechenden Stellen der Vorderflügeloberfläche in der Discoidalzelle (vgl. Aderbild 19a), a von dem b-Flügel mit verkleinerten, b von dem wildfarbigen Flügel mit vergrößerten Schuppen eines b/+ -Heterozygoten. 200/1

Ein $ml/+$ -Mosaik ist in anderer Hinsicht bemerkenswert (Abb. 16). Der ml -Flügel ist zugleich stark aufgehellt. Da der Aufhellungsfaktor (Pm) der am

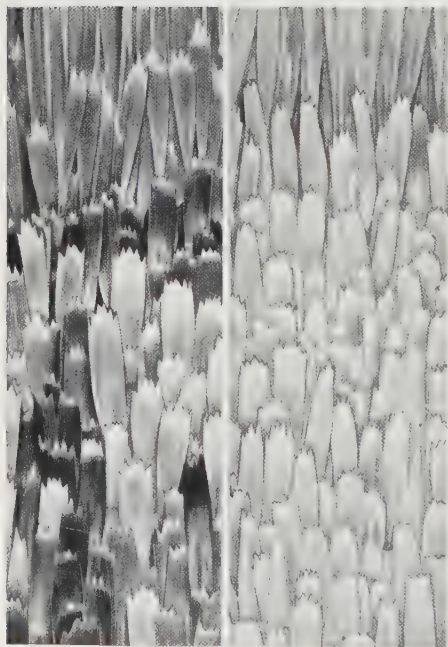


a

b₁b₂

Abb. 15a u. b. Halbseitenmosaiks aus Rückkreuzungen. a ♀, rechts ml unvollständig herausgespalten.

b Flügel eines ♂, b₁ linker Flügel normal, b₂ ml . 5,5/1



häufigsten sich in Halbseitenmosaiks zeigt, von ml unabhängig verteilt wird, so geht daraus hervor, daß bei *Ephestia* unter der Wirkung von *Mo* mehrere Chromosomen ausfallen können, zugleich in einer Mitose oder nacheinander, ohne daß dadurch eine zell-letale Wirkung in dem betroffenen Körperteil eintritt. Die Schuppengröße wird bei dem Herausspalten von ml und Pm zusammen ebenso wenig wie bei der unregelmäßigen Verteilung der entsprechenden Chromosomen allein verändert, ist also nicht einfach von der „Chromatinmenge“ abhängig.

Abb. 16. Einander entsprechende Stücke vom Außenrand der beiden Flügel eines F_1 -Mosaik- $\frac{ml}{+}; \frac{Mo}{+}$ (Wildmuster); rechts ml und aufgehellt. 70/1

Überraschende Mosaikmuster traten in einem aus F_2 gewonnenen *Sy-dz-Mo*-Stamm auf; da *Sy* homozygot letal ist, spaltet er immer nach *Sy* und Sy^+ . Das Symmetriefeld (– Zentralfeld + helle Querbinden) wird durch die additive

Wirkung von *Sy* und *dz* stark verschmälert (Abb. 17 b₁, vgl. Abb. 2a). Bei einem ♀-Falter (Abb. 17 a) ist auf dem linken Flügel die Symmetriefeldverschmälierung gesteigert und die Zonengliederung des Symmetriefelds ist weitgehend verändert. Genau dieselbe Störung des Symmetriefeldmusters ist bekannt als Wirkung einer Hitze- oder Brennzeizung von *Sy* + -Puppen in einem sensiblen Stadium (KÜHN und HENKE 1936, Abb. 98, 100) und ebenso als Folge von Brennzeizen in einem bestimmten Puppenalter, in dem sie auch bei + -Tieren erzielt wird (KÜHN und v. ENGELHARDT 1933, Abb. 12k). Sie wird erklärt durch die *Hemmung eines*



Abb. 17 a u. b. Flügel von Mosaik-♀ aus einer *Sy-dz-Mo*-Zucht. a₁ vermutlich *Sy dz*, a₂ *Sy/+ dz*; b₁ *Sy/+ dz*, b₂ vermutlich *Sy/Sy/+ dz*. 8/1

Ausbreitungsvorgangs, der von der Symmetrieachse ausgeht und während seines Fortschreitens die Determination der Gliederung vollzieht: Zuerst tritt ein Zustand ein, der die weißen Schuppen determiniert; dann schreitet dieser Vorgang apikal- und basalwärts fort und bedingt die weißen Querbinden am Symmetriefeldrand, dann folgt ein Zustand, der die schwarzen Schuppen determiniert; auch er rückt nach dem Rand hin vor und bildet die dunklen Begleitbinden. Schließlich wird im Innern des Felds die Untergrundbeschuppung des Zentralfelds determiniert (KÜHN u. v. ENGELHARDT 1933, KÜHN u. HENKE 1936, S. 264ff). Durch Hitze- oder Brennzeizung kann dieser Vorgang auf bestimmten Stadien stillgestellt werden. Bei *Sy* + -Tieren verläuft er langsamer: er kommt bei Brennzeizungen im gleichen Puppenalter bei einem geringeren Ausbreitungsgrad zum Stillstand. Eine Stillstellung in einem frühen Ausbreitungsstadium ist bei dem Flügel der Abb. 17 a unter *Mo*-Wirkung eingetreten. Der rechte Flügel hat ein wesentlich breiteres Symmetriefeld als es *Sy* + ; *dz* entspricht. Dadurch wird die Vermutung nahegelegt, daß links eine verstärkte *Sy*-Wirkung durch Wegfall eines + -Chromosoms und rechts eine Kompensation der *Sy*-Wirkung durch ein zusätzliches + -Chromosom eingetreten ist (Abb. 18a). Noch eigenartiger

ist der rechte Flügel in Abb. 17b abgeändert: Hier ist eine weiße Zone auf die Flügelmitte beschränkt, ein Bild wie es bei extremen Brennerfolgen zu Beginn der Ausbreitungsperiode auch beinahe erreicht werden kann (KÜHN u. v. ENGELHARDT 1933, Abb. 12m). Diese „Über-Sy“-Wirkung läßt sich chromosomal so interpretieren, daß die rechte Flügelanlage beide *Sy*-Chromatiden zugeteilt erhalten hat (Abb. 18b). In diesem Fall steht aber der angenommenen Trisomie des rechten Flügels keine entsprechende Monosomie des linken Flügels gegenüber; denn er zeigt den *Sy*/+; *dz*-Phänotypus. Da aber häufig nur ein Flügel Mosaikmerkmale zeigt und ein unsymmetrisches Herausspalten bei „Halbseitenmosaiks“

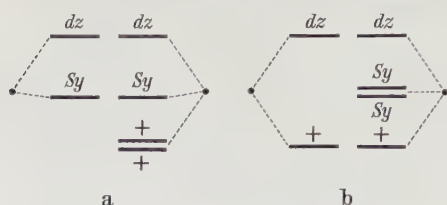


Abb. 18a u. b. Chromosomale Interpretation zu Abb. 17

am Körper gelegentlich abzulesen ist (z. B. Abb. 15a), steht der Annahme nichts im Wege, daß sich erst in der *Anlage* des rechten Flügels ein Vorgang entsprechend Abb. 18b abgespielt hat. Die in den Zuchten herausspaltenden *Sy*/*Sy*-Tiere sterben zwar während der Embryonalentwicklung ab (SEEGER 1955); aber es ist durchaus möglich,

daß 1 *Sy* ohne + -Allel in späteren Entwicklungsstadien und in bestimmten Organanlagen nicht zell-letal wirkt. Eine positive entwicklungsphysiologische Wirkung des mutierten „Allels *Sy*“ muß nicht angenommen werden; die *Sy*-Wirkung kann auf einem Ausfall eines positiv wirkenden Gens beruhen, das eine stärkere Ausbreitung des Symmetriefelds bewirkt. Die endgültige Symmetriefeldausbreitung ist ein Gleichgewichtszustand zwischen antreibenden und hemmenden genetischen Faktoren und Außenbedingungen: Eine *Symmetriefeldverbreiterung* wird bewirkt durch die Mutation *Syb* (KÜHN und HENKE 1936) und durch einen Wärmereiz (35°, 24 Std) in weitem Bereich der Puppenruhe (STUBBE 1938) und durch einen Hitzereiz (45°, 45 min) in einem Abschnitt am Anfang der sensiblen Periode (KÜHN und HENKE 1936). Verschmälert wird das Symmetriefeld durch die Mutationen *Sy*, *dz* und *Hu* (s. S. 1), sowie durch Hitzereize in einem anderen Abschnitt der sensiblen Periode (FELDOTTO 1933, KÜHN u. HENKE 1936). Jedenfalls wirkt *Sy*⁺ antreibend auf die Symmetriefeldausbreitung. Falls im selben Chromosom auch ein antagonistisch wirkendes Gen sitzt, sind die Phänotypen von Abb. 17b₁ = *Sy*/+; *dz*, von a₂ = *Sy*/++; *dz*, von a₁ *Sy*; *dz* und von b₂ *Sy*/*Sy*+; *dz* leicht durch Zahlenbeispiele zu erläutern (z. B. durch die Annahme, daß *Sy*⁺ die Tendenz hat um 6% zu verbreitern (→), *Sy* = 0 ist, und daß ein antagonistisches Gen an einem anderen Locus desselben Chromosoms um 2% verschmälert (←). Man erhält dann für +/+ → 8, für *Sy*/+ → 2, für *Sy*/++ → 6, für *Sy*/*Sy*+ 0).

Ein Beweis für die Gültigkeit der wahrscheinlichen chromosomalen Interpretation dieser Fälle mit *Sy* läßt sich allerdings nicht führen.

5. Halbseitiges Herausspalten von Mustern nicht als Mutanten bekannter Faktoren

In einer Anzahl von Fällen erschienen Flügel-Halbseiten-Mosaiks mit Musterabänderungen, die sich nicht auf bekannte Faktoren beziehen lassen. Abb. 19 zeigt in b und c rechte Flügel von 2 Tieren aus dem *dz*-*Mo*-Stamm, bei denen das *Symmetriefeld* vollkommen fehlt. Abb. 19b schließt sich als Abbaustufe dieses Zeichnungssystems unmittelbar an Abb. 17b₂ an. Die Ansammlung dunkler Schuppen entlang den Adern, die bei den Flügeln der Abb. 17 an dem Weiß der Querbinden bzw. an der weißen Zentralzone des Flügels b₂ endet, zieht hier durch den ganzen Flügel, wie der Vergleich mit dem Adermuster Abb. 19a zeigt. Eine

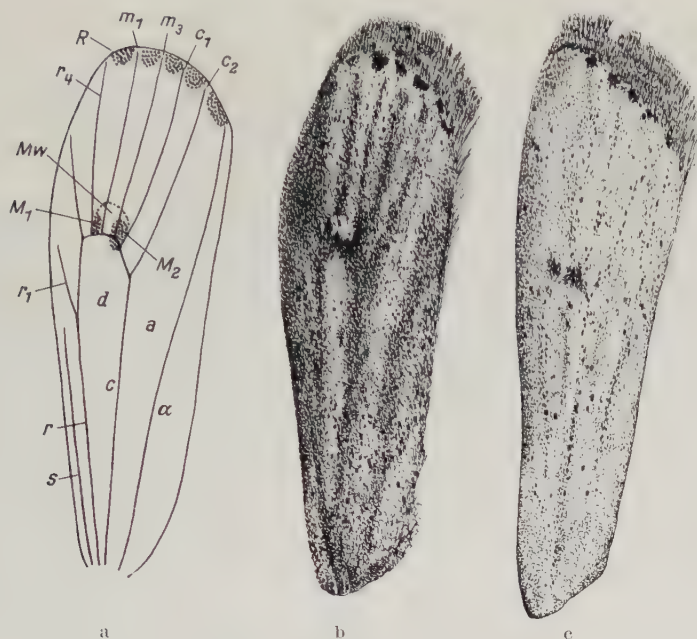


Abb. 19. a Adermuster, a Analysfeld, d Discoidalzelle, Adern: s Subcosta, r Radius und seine Äste r_1 — r_4 , m_1 , m_3 Mediaäste, c Cubitus, seine Äste c_1 , c_2 , α Axillaris, M_1 , M_2 dunkle Mittelflecken, Mw weißer Mittelfleck, R Randfleck. b, c rechte Flügel von Tieren aus dem *dz-Mo*-Stamm ohne Symmetriesystem, b mit dunklen Streifen entlang den Adern, Mittel- und Randflecken, c stark aufgehellt, außer in den Mittel- und Randflecken nur wenige verstreute schwarze Schuppen, vor allem längs der Adern. 8/1

solche Unterdrückung der Ausbildung des Symmetriesystems und durchlaufende Aderschwärzung wurde in einzelnen Fällen auch durch Brennversuche vor Beginn der Symmetriefeldausbildung erzielt (KÜHN u. v. ENGELHARDT 1933, Abb. 17).

Auf dem Flügel Abb. 19c sind fast alle Schuppen in hohem Grade verblaßt und verkleinert (Abb. 20b): nur einzelne eingestreute Schuppen, vor allem auf den Adern, haben normale Größe. Sehr deutlich heben sich bei diesen beiden Flügeln die in ihrer Determination vom Symmetriesystem unabhängigen Systemelemente der Mittelflecken und der Randflecken

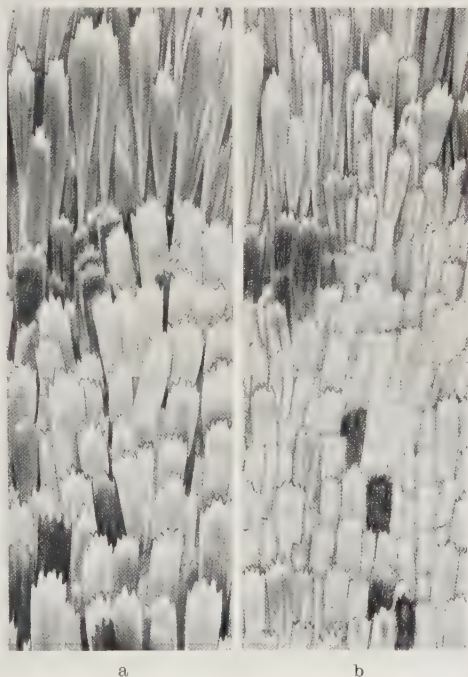


Abb. 20a u. b. Einander entsprechende Stücke vom Flügelrand aus dem linken und rechten Flügel des Halbseitenmosaiks, dessen rechter Flügel in Abb. 19c wiedergegeben ist. Die aufgehellten Schuppen sind stark verkleinert.

heraus: Auch in den Brennversuchen werden sie durch die Veränderungen des Symmetriefeldes nicht beeinflusst (KÜHN und v. ENGELHARDT 1933, Abb. 12 l, m).

Abb. 21 zeigt in a_1 und b_1 einen stark aufgehellten linken Flügel eines $\frac{U_s}{U_s} \frac{Mo}{U_s}$ -Tieres. Die aufgehellten Schuppen sind fast alle verkleinert, z. T. sehr stark. Es fällt auf, daß dunkle Zeichnungsschuppen, vor allem in den Randflecken, der

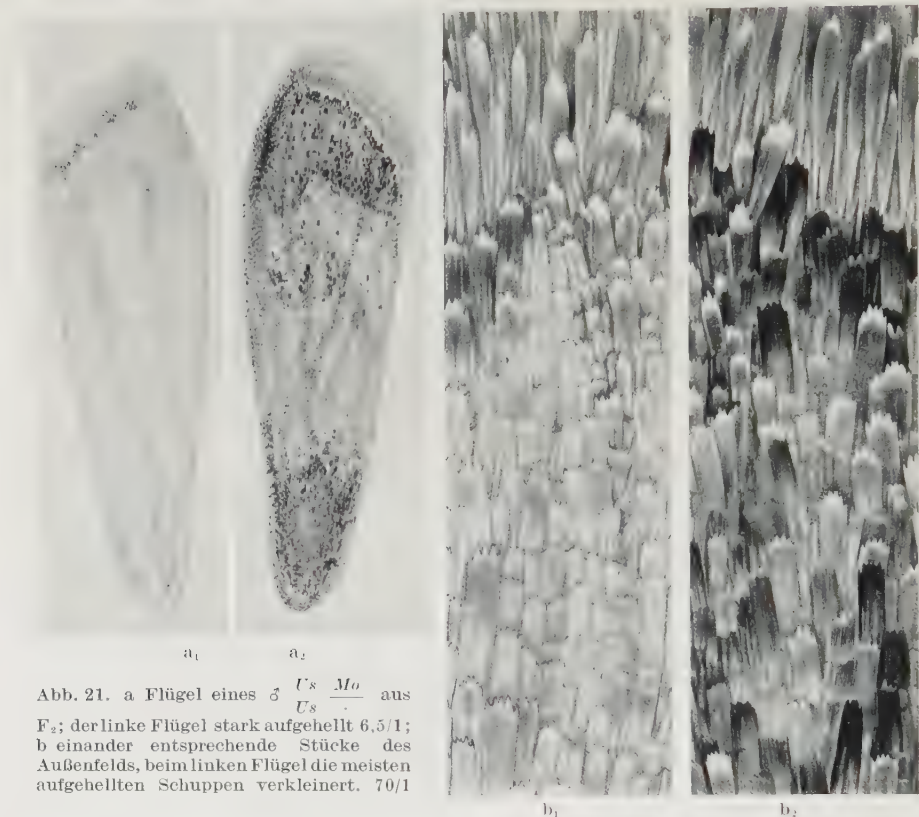


Abb. 21. a Flügel eines ♂ $\frac{U_s}{U_s} \frac{Mo}{U_s}$ aus F_2 ; der linke Flügel stark aufgehellt 6,5/1; b einander entsprechende Stücke des Außenfelds, beim linken Flügel die meisten aufgehellten Schuppen verkleinert. 70/1

Verkleinerung stärkeren Widerstand entgegensetzen als hellere — ebenso wie die schwarzen Schuppen in Randflecken, Mittelflecken und auf den Adern in Abb. 19c und 20b.

Bei einem Mosaik aus dem *dz-Mo*-Stamm (Abb. 22b) ist der linke Flügel *verdunkelt*, und die Schuppen sind zum Teil *verkleinert*, wie der Vergleich mit dem normalen Wildmuster Abb. 22a zeigt. Die Verdunkelung erinnert an eines der bei der Mutation *ed* (KÜHN 1944, Abb. 1b) auftretenden Merkmale: Schuppen heller Größen- und Formtypen (Abb. 4, 5 V, VII VIII) werden bis ans Schuppenende mit Pigment beladen. Der rechte Flügel ist im Gegenteil *aufgehellt*; dabei handelt es sich aber nicht um einen Entpigmentierungstypus wie bei den verkleinerten Schuppen in Abb. 20b und 21 b_1 : In Abb. 22 b_2 sind die Unterschiede zwischen den Schuppentypen durchaus erhalten, nur sind alle bis zu einem bestimmten Grade verblaßt. Dabei sind die Schuppen sehr stark gegenüber den normalen Dimensionen (Abb. 22a) *vergrößert*. Die gegensinnigen Veränderungen der

Pigmentierung und der Schuppengröße auf der einen und der anderen Seite sprechen für eine frühembryonale unregelmäßige Chromosomenverteilung, ohne

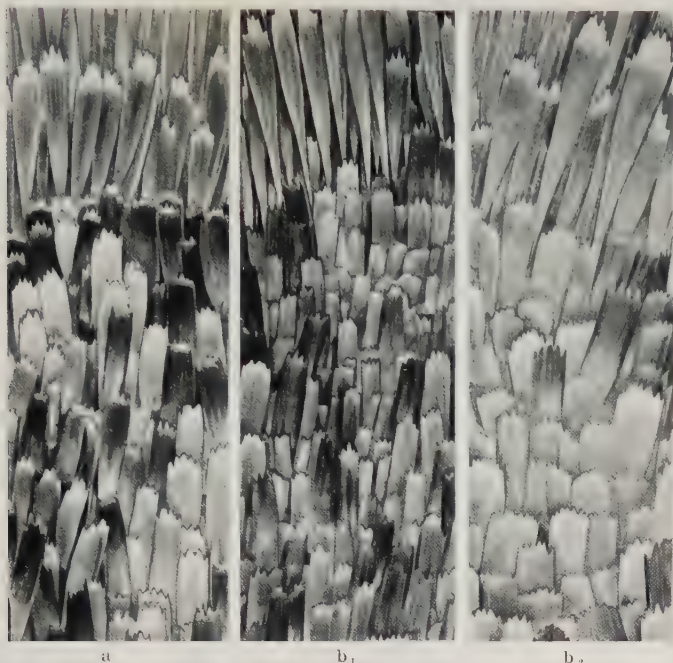


Abb. 22 a u. b. Einander entsprechende Stücke vom Flügelaußenrand von F_2 -Faltern. a Normales Wildmuster, b_1 , b_2 von einem Mosaik, im linken Flügel sind die Schuppen verkleinert und verdunkelt, im rechten vergrößert und aufgehellt. 70/1

daß man in diesem Fall aus den Phänotypen einen Schluß auf Chromosomen ziehen könnte, die bestimmte Gene enthalten, wie bei den $b/+$ - und $ml/+$ -Mosaiks.

Jedenfalls wird die Schuppengröße durch mehrere verschiedene Gene beeinflusst. Ein Falter aus dem *dz-Mo*-Stamm trug auf dem linken Flügel normal große Schuppen, auf dem rechten aufgehellte Riesenschuppen und auf einem Teil des Abdomens Zwergschuppen (Abb. 23). Bei einem F_1 -♀ mit Wildmuster waren die Schuppen des linken Flügels normal gestaltete und gefärbte Zwergschuppen, die viel dichter standen als die Normal-schuppen des anderen Flügels. Auch hier beruht die Schuppenverkleinerung also nicht nur auf einer Hemmung des Schuppenwachstums sondern einer Umstellung des ganzen Epithelmusters.

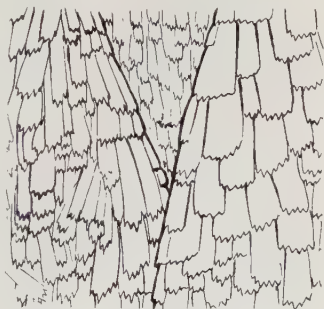


Abb. 23. Stück der Rückenansicht eines Falters aus dem *dz-Mo*-Stamm an der Stelle wo die Vorderflügel einander berühren, davor der Rücken des Abdomens. Auf dem linken Flügel normal große Schuppen, auf dem rechten Riesenschuppen, auf dem Abdomen Zwergschuppen.

60/1

6. Mosaikstücke auf den Flügeln

Nach den Halbseiten-Flügelhelligkeitsmosaiks waren am häufigsten im *dz-Mo*-Stamm und in Mosaiks aus F_1 und F_2 Flügel mit Flecken oder Streifen



Abb. 24 a u. b. Linker Flügel eines ♀ und rechter eines ♂ aus dem *dz-Mo*-Stamm mit Streifen stark aufgehellter, verkleinerter Schuppen. 8/1

veränderter Schuppenpigmentierung, oft auch der Schuppengröße. Die Streifen können die ganze Flügellänge durchziehen oder nur von der Schuppenmitte nach außen laufen (Abb. 24). Die Streifen verlaufen immer längs, nie quer über den Flügel. Das hängt offenbar mit den Teilungsrichtungen der Zellen während des Wachsens der Flügelanlage zusammen. Auch *b*-Sektoren auf wildfarbigen F_1 -Flügeln kommen vor und zeigen damit an, daß es sich auch hier um unregelmäßige Chromosomenverteilung handelt. Der rechte Flügel des *Us/+; Mo/+*-Falters der Abb. 25 ist fast ganz von beinahe pigmentlosen, meist nach dem Ende zu verschmälerten Schuppen bedeckt, nur in schmalen Längszügen stehen dunkle Schuppen von normaler Form. Hier fehlen die Rand- und Mittelflecken.

Mehrfachmosaiks kommen als Stücke auf Flügeln öfters vor. Auf dem linken



Abb. 25. a Mosaikflügel (8/1) eines F_1 -♂ *Us dz Mo* rechter Flügel stark aufgehellt mit wenigen dunklen Schuppen in Längsstreifen; b einander entsprechende Stücke vom Flügelaußenrand, rechts die Schuppen zumeist deformiert. 70/1



b



Abb. 26



Abb. 27

Abb. 26. Flügel eines Mosaiks $\frac{b}{b} \frac{Mo}{-}$ aus F_2 . Linker Flügel aufgeheilt, im Wurzelfeld und im basalen Teil des Infelds, am Vorder- und am Hinterrand in den Mittel- und Randflecken schwarze Schuppen, im Gebiet der Discoidalzelle und nach außen darüber hinaus ganz helle Schuppen. 8/1

Abb. 27. Rechter Flügel (8/1) eines ♀ aus F_1 $\frac{Hu}{-} \frac{Mo}{+}$ fast ohne Muster, die meisten Schuppen verkleinert, ein Flügelstück mit stark vergrößerten Schuppen (der linke Flügel ist normal, *Hu* intermediär)

Abb. 28. Aus der Puppe herauspräparierte Vorderflügel eines nicht geschlüpften Mosaiks $\frac{b}{b} \frac{+}{+}$; $\frac{Mo}{+}$. Ganz unregelmäßig verteilte Farb- und Größentypen von Schuppen auf beiden Flügeln. 25/1

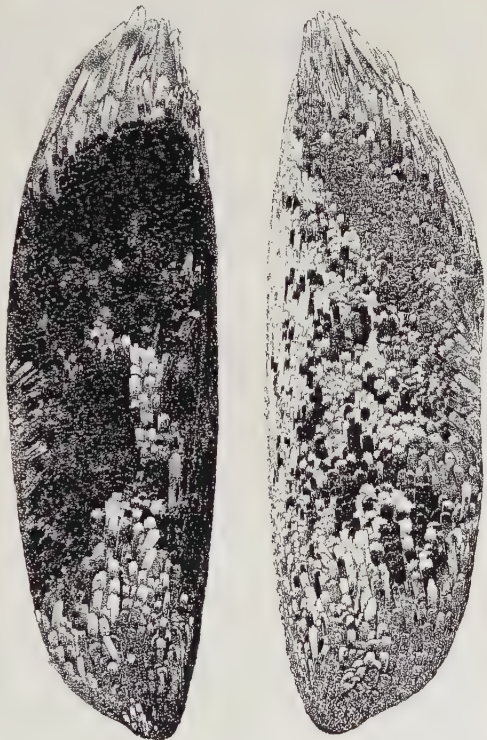


Abb. 28

Flügel eines $\frac{b}{b}$; $\frac{Mo}{-}$ -Falters (Abb. 26) aus F_2 ist der größte Teil aufgeheilt, wie es etwa dem Verluste eines *Pm*-Chromosoms entspricht (vgl. Abb. 3b₂); in dem Bereich der Discoidalzelle und distalwärts noch darüber hinaus sind die Schuppen ganz hell; basalwärts und am Flügelvorderrand ist das weiße Feld von schwarzen Schuppen umsäumt, und aus dem Weiß heben sich die Mittelflecken heraus. Bei einem $\frac{Hu}{+}$; $\frac{dz}{+}$; $\frac{Mo}{+}$ -♂ aus F_1 (Abb. 27) ist von einem bis auf die Mittelflecken fast muster-

losen rechten Flügel mit verkleinerten Schuppen ein Stück mit Riesenschuppen besetzt. Auch hier sind sicher 2 verschiedene Unregelmäßigkeiten der Chromosomenverteilung vorgekommen. Vor dem Schlüpfen aus der Puppenhülle gestorben ist ein F_1 -Falter, auf dessen beiden Flügeln mehrere große oder kleine Flecken mit abnormen Schuppenfarben und Schuppengrößen ganz unregelmäßig verteilt sind (Abb. 28): links viele *b*-Schuppen, daneben vergrößerte Wildschuppen, rechts normalgroße, vergrößerte und verkleinerte Schuppen verschiedener Farbtypen und nach dem Außenrand hin ein Bezirk mit ganz dicht stehenden grauen Zwergschuppen. Hier müssen in den Flügeln mehrere verschiedene Chromosomen betreffende unregelmäßige Mitosen dieses wirre Mosaik geschaffen haben, mit dem auch eine allgemeine Vitalitätsstörung verbunden war, die schließlich zum Tode des fast fertig entwickelten Tieres führte.

7. Diskussion

Mosaikbildungen sind vielfach beschrieben worden, vor allem bei *Drosophila*-Arten, wo sie am eingehendsten analysiert wurden. Meist sind die entstehenden Mosaiks Gynander. Eine Elimination von Chromosomen ist bei der Mutante *claret* von *Drosophila simulans* festgestellt, wo das mütterliche X-Chromosom und das IV. Chromosom häufig eliminiert gefunden werden, wie aus genetischen Beobachtungen erschlossen und für das IV. Chromosom auch cytologisch bestätigt werden konnte. STURTEVANT (1929, S. 342) schloß, daß „die Elimination hauptsächlich oder ausschließlich in den ersten Furchungsteilungen geschieht“. Durch WALDS cytologische Untersuchungen (1936) wurde der Eliminationsvorgang bei *claret*, der auch die letale Elimination des II. oder III. Chromosoms herbeiführen kann, auf die 1. Reifungsteilung zurückverlegt. BRIDGES (1925a) hat bei der im X-Chromosom lokalisierten, homozygot letalen Mutation *Minute-n* von *Drosophila melanogaster* gefunden, daß nicht nur das mütterliche X, sondern wahrscheinlich auch ein ganzer Chromosomensatz eliminiert werden kann, wodurch haploide Mosaikbezirke entstehen. Diese sind im Geschlecht nicht verändert, da die Relation zwischen X und Autosomen dieselbe bleibt. Solche Haploide hat BRIDGES (1925b) bei *Drosophila melanogaster* auch nachgewiesen. CREW u. LAMY (1936) beschrieben bei ♀♀ von *Drosophila pseudo-obscura* einen zwischen Diploidie und Haploidie sich abspielenden Mosaicismus, der auf Befruchtungsanomalien beruhen soll. Die Autoren geben in einer Tafel (Plate V) 15 Typen der Verteilung der normalen und der Mosaikfelder wieder, welche für den Vergleich mit den *Ephesia*-Mosaiks besonders wertvoll sind: Vollkommen symmetrische Halbseitenmosaiks sind selten (Plate V, A). Symmetrische Halbseitenmosaiks in kleineren oder größeren Körperabschnitten sind häufig (D, E, F, G, H, I, K, M). Die Flügel zeigen oft Einsprengungen anderer Areale als der Mesothorax. Manchmal scheinen sie selbständigen Verteilungssprüngen zu entstammen (D, I). Öfters lassen die Bilder hervorschießen, daß in dem Epidermisgebiet, aus dem die Flügelimaginalscheibe hervorging, normale und abnorme, nach den Autoren diploide und haploide Zellen, gemischt waren (D, L, M). In einigen Fällen war offenbar die Verteilungsstörung auf einen kleinen Abschnitt des Meso- und Metathorax mit den Flügel- und Halteren-Imaginalscheiben beschränkt (N). Querverlaufende Grenzen zwischen Kopf und Thorax, Thorax und Abdomen, aber auch ohne Rücksicht auf Segmentgrenzen sind nicht selten. STERN, der früher (1927)

die Mosaikerscheinungen auf die Elimination von Chromosomen oder Chromosomenstücken bezogen hatte, hat dann (1936) in geistreichen Überlegungen und scharfsinnig angestellten Kreuzungen gezeigt, daß bei bestimmten *Minute*-Faktoren von *Drosophila melanogaster* auftretende Mosaiks nicht durch einfache Elimination, sondern durch somatisches Crossing over zu erklären sind, das zwischen 2 Chromatiden in einem Vierstrangstadium stattfindet und zu einer Homozygotie ursprünglich heterozygot vorhandener Gene führen kann.

Bei *Ephestia* mit haploid 29 Autosomen (WAGNER 1931) läßt sich die aus den Phänotypen erschlossene *unregelmäßige Chromosomenverteilung* cytologisch nicht prüfen, und Koppelungsgruppen wie bei *Drosophila* stehen nicht zur Verfügung. Jedenfalls spielt sich der zur Mosaikbildung führende Vorgang nicht nur an dem den *Mo*-Faktor enthaltenden Chromosom ab, sondern er kann verschiedene Chromosomen in verschiedenen Abschnitten der Entwicklung treffen. Das zeigt das mosaikhafte Auftreten nicht gekoppelter Gene halbseitig und in kleineren Bezirken. Das einfache Herausspalten rezessiver Allele ließe sich durch den von STERN erschlossenen Vorgang erklären. Mosaikbildungen bei Homozygoten und die *gegensinnigen Abänderungen*, bei denen die Halbseitenmosaiks und Mosaikstücke auf den Flügeln dasselbe Merkmal, das in dem einen Bezirk abgeschwächt ist, in dem damit zusammenhängenden anderen gegenüber der Norm verstärkt auftritt, sprechen aber entschieden dafür, daß in den Zellen des einen Bezirks ein Chromosom fehlt, das auf der anderen Seite zu viel ist. Theoretisch könnte es sich auch um die unregelmäßige Verteilung bestimmter Chromosomenstücke handeln, die allerdings an ganz verschiedenen Chromosomen ausgelöst werden müßte. Das ließe sich nur entscheiden, wenn hinreichend Koppelungsgruppen bekannt wären.

Sehr häufig werden die *Pigmentmenge* und die *Größe der Schuppen* mosaikhafte verändert. Daß dabei jeweils bestimmte Faktoren im Spiele sind und nicht einfach die „Chromatinmenge“, wird dadurch bewiesen, daß jene Erscheinungen nicht mit jedem Herausspalten verknüpft sind, aber regelmäßig mit bestimmten. Mit einer Verkleinerung oder Vergrößerung der Schuppen und ihrer Bälge ist immer auch eine entsprechende Veränderung der Abstände der Schuppenapparate voneinander verknüpft, so daß der Flügel immer gleich dicht besetzt bleibt. Es wird also nicht nur das Wachstum der Schuppenbildungszellen und der Schuppen, sondern das ganze *Epithelmuster* im Anschluß an die unregelmäßige Chromosomenverteilung in einem großen oder kleinen Epidermisbezirk abgeändert. Wahrscheinlich wird primär die Zellgröße betroffen. Da hiermit nur eine geringe oder gar keine Veränderung der Gesamtgröße des Flügels oder Flügelteils verbunden ist, muß mit der Veränderung der Zellgröße eine Regulation der Teilungshäufigkeit verknüpft sein, so daß dieselbe Epithelfläche mehr kleinere oder weniger große Zellen erhält. Darüber wird dann die Determination des Zeichnungsmusters ausgebreitet, deren Stücke dann jeweils aus mehr kleinen oder weniger großen Schuppen zusammengesetzt sind: *Herstellung eines Musters in Rastern mit verschieden großen Rasterelementen* (vgl. KÜHN 1943, Abb. 1 III).

Die *Anfälligkeit der Chromosomen für die Mo-Wirkung* ist jedenfalls nicht gleich. Unter 494 registrierten Mosaiktieren waren 294 Halbseiten-Helligkeitsmosaiks (= 58%); bei einem Teil war die Gegenseite des aufgehellten Flügels verdunkelt. Beiderseits aufgehellte Tiere wurden 12 festgestellt. Ein bestimmtes

Chromosom, das ein die Pigmentmenge in den Schuppen additiv beeinflussendes Gen (*Pm*) enthält, wird also verhältnismäßig leicht schon in frühen embryonalen Zellteilungen unregelmäßig verteilt.

Pm kann mit dem *Mo*-Faktor gekoppelt sein; aber es ist auch möglich, daß *Mo* und *Pm* in verschiedenen Chromosomen liegen und das Auftreten eines Helligkeitsmosaiks die Empfindlichkeit des *Pm*-Chromosoms für die *Mo*-Wirkung anzeigt.

Wenn in einem Halbseitenmosaik auch die Keimbahn betroffen wird, und auch monosome Urkeimzellen sich bis zur Reifung entwickeln, müssen Gameten ohne *Pm*-Chromosom entstehen. Falls auch diese befruchtungsfähig sind und auch für *Pm* monosome Zygoten sich zu Faltern entwickeln, sind von vornherein durch ihren Chromosomenbestand zu beiderseitiger Aufhellung bestimmte Tiere in bestimmten Anzahlen nach einem oder beiden phän. *Mo*-Eltern zu erwarten.

Tabelle 6. Häufigkeit von Mosaiks aus Eltern ohne oder mit *Mo*-Phänotypus

Phänotypen der Eltern	n	phän. <i>Mo</i>
norm. ♀ × norm. ♂	545	18,9
<i>Mo</i> ♀ × norm. ♂	424	22,9
norm. ♀ × <i>Mo</i> ♂	427	24,0
<i>Mo</i> ♀ × <i>Mo</i> ♂	188	23,5

Sie erscheinen aber nicht. Die Häufigkeit der Mosaiktiere ist innerhalb der Fehlergrenzen gleich, unabhängig davon, ob sich die *Mo*-Wirkung im Phänotypus der Eltern zeigt oder nicht (Tabelle 6). Die wenigen beiderseits aufgehellten Falter, die gefunden wurden, stammten alle aus Zuchten mit phänotypisch normalen Eltern. Daß die Vitalität der Zuchten so stark abfällt, wenn ein Elter Mosaik ist oder beide Eltern Mosaik-

merkmale zeigen (Tabelle 3), steht im Einklang damit, daß aus monosomen Keimzellen keine Falter entstehen.

Von eingekreuzten rezessiven Allelen spaltet am häufigsten *b* heraus. Halbseitige und sektorale *b*-Bezirke kamen gelegentlich schon früher bei Heterozygoten in Kreuzungen von Stämmen vor, in denen Mosaikerscheinungen sonst nicht beobachtet wurden. In F_1 $b/+$; $Mo/+$ erschienen unter 1282 Faltern 16 (= 1,2%) mit einem *b*-Flügel; unter diesen waren 5 aufgehellt. Bei 2 weiteren waren Streifen im Wildmuster eines Flügels schwarz. Vereinzelte *b*-Mosaiks kamen auch in F_2 heraus. Unter 1464 $ml/+$ -Tieren waren 9 (= 0,6%) einseitig *ml*, in einem Fall war der *ml*-Flügel aufgehellt. Der Faktor *he* wurde unter 617 F_1 -Tieren einmal einseitig und in einer F_2 in einem Längsstreifen im $+-$ -Muster gefunden. In einer F_2 mit *wa* erschien ein Tier, dessen eines Auge weiß war.

In verhältnismäßig seltenen Fällen unter den großen Anzahlen der Falter im *Mo*-Stamm und in Kreuzungen erschienen halbseitig Abänderungen, die nicht auf bestimmte bekannte Gene zurückgeführt werden können, aber durch unregelmäßige Chromosomenverteilung zu erklären sind. Sie betreffen eine Änderung der Pigmentierung oder der Größe der Schuppen oder der Ausbildung der Muster-systeme auf dem Flügel.

Bei den Fleck- und Streifenmosaiks, die nach den Halbseiten-Helligkeitsmosaiks am häufigsten vorkommen, findet die unregelmäßige Chromosomenverteilung spät in der Organentwicklung statt. Dabei erscheinen häufig Manifestationen von Faktoren, die nicht als Mutationen und nicht von Halbseitenmosaiks bekannt sind. Entweder werden jetzt leichter andere Chromosomen von der *Mo*-Wirkung betroffen als früher in der Entwicklung, oder in der Flügel-

entwicklung werden anormale Chromosomenzusammenstellungen ertragen, die in früheren Stadien oder in anderen Organen tödlich wirken.

Aus der Gesamtheit der Mosaikfälle geht hervor, daß die normale Ausprägung der abänderbaren Merkmale von zahlreichen Genen abhängt, und daß durch *Mo* viele, wenn auch vielleicht nicht alle Chromosomen aus der normalen Verteilung abgelenkt werden können.

Eine einseitige Hemmung in der Ausbildung der Geschlechtsorgane wurde nicht gefunden. Die beobachteten Verkümmierungen der Ovarien bei *Mo*-♀♀ kommen offenbar durch eine Störung allgemeiner Entwicklungsbedingungen (Stoffwechselvorgänge) zustande.

Die Geschlechtschromosomen scheinen sehr unempfindlich für die *Mo*-Wirkung zu sein, da nie Gynander gefunden wurden, auch nie somatisches Herausspalten von *dz* auf Flügeln heterozygoter ♂♂, was ohne Gynandrie auf einen örtlichen X-Chromosomenverlust (oder ein Crossing over im Sinn von STERN) schließen ließe. Doch liegt ein abnormes Kreuzungsergebnis vor, das durch die Annahme zu erklären ist, daß in der männlichen Keimbahn Zellen mit 3 X entstehen und reifen können. In zwei gleichzeitig laufenden F_2 -Zuchten *Mo*/+; *Hu*/+; + × *Mo*/+; +/+; *dz*/+ (vgl. Tabelle 2, VII × X) erschienen in der einen erwartungsgemäß unter 218 Individuen die Phänotypen *wild* (Abb. 29a), *Hu* (Abb. 29b), *dz* (Abb. 2a) und *Hu dz* (Abb. 29c) angenähert in dem Verhältnis 3:3:1:1 in der normalen Geschlechtsverteilung:

	♀				♂	
Phänotypen:	<i>wild</i>	<i>Hu</i>	<i>dz</i>	<i>Hu dz</i>	<i>wild</i>	<i>Hu</i>
	31	27	26	23	61	50
	49,1%				50,9%	

In einer 2. Zucht traten dieselben Phänotypen auf, aber angenähert in dem Verhältnis 5:5:1:1 und in einem ganz abweichenden Geschlechtsverhältnis:

	♀				♂	
Phänotypen:	<i>wild</i>	<i>Hu</i>	<i>dz</i>	<i>Hu dz</i>	<i>wild</i>	<i>Hu</i>
	31	23	14	16	52	62
	34,2%				64,8%	

Unter 3193 Individuen des *Mo*-Stammes (Tabelle 1) machen die ♂♂ 54,4%, unter 7731 F_1 - und F_2 -Individuen 51,93% aus. Der Anteil der ♂♂ von 64,8% in der Ausnahmekreuzung liegt außerhalb der Fehlergrenzen. Ein Geschlechtsverhältnis von 2 ♂♂:1 ♀♀ und die gefundene Verschiebung des Phänotypenverhältnisses ist zu erwarten, wenn von 3 X-Spermatocyten *dz*/+/-+ bei der Reduktion die 4 Spermientypen 1) *dz*, 2) *dz*+, 3) + und 4) +/+ gebildet werden, alle gleich befruchtungsfähig sind und Zygoten oder sich entwickelnde Tiere mit 3 X absterben.

Mosaikmerkmale an *Raupen* und *Puppen* sind in unserem *Mo*-Stamm nicht beobachtet worden. Da beide Stadien bei *Ephestia* kein Zeichnungsmuster, wie bei vielen anderen Schmetterlingen, haben, könnten sie sich nur bei genauer Untersuchung der Borsten, Cuticularmuster usw. zeigen. Ein Zufallsbefund bei *Ptychopoda seriata*, unserem anderen Hauptversuchstier, veranschaulicht



Abb. 29a—c. Flügel von ♀ Faltern aus F_2 (nach Tabelle 2 VII *Hu* × *X* wild). a Wildmuster, b *Hu*-, c *Hu dz*-Muster. 8/1

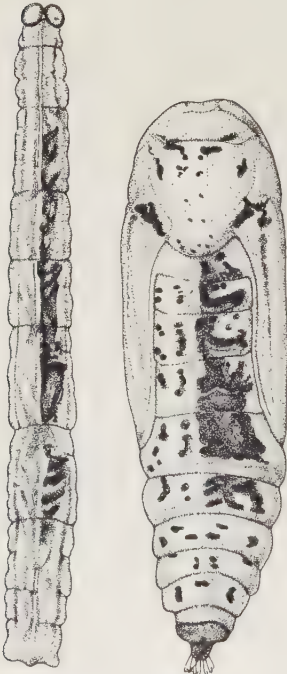


Abb. 30. Einseitige Verdunkelung der Raupen- und Puppenzeichnung im Metathorax und 5 Abdominalsegmenten bei *Ptychopoda seriata* SCHRK.

aber ein Mosaik des Raupen- und Puppen-Cuticularzeichnungsmusters genau halbseitig auf dem Metathorax und 5 Abdominalsegmenten (Abb. 30). Der aus der Puppe schlüpfende Falter zeigte keine Mosaikmerkmale und verhielt sich als normales ♂. Der Mosaikcharakter war also ganz auf die *Leistung der Epidermis in bestimmten Stadien* beschränkt.

Zusammenfassung

Durch die Mutation *Mo* werden homozygot ungefähr 20%, heterozygot ungefähr 4% Mosaiktieri bestimmt. *Mo* ist nicht geschlechtsgekoppelt. Die Häufigkeit der Manifestation wird durch *dz* und eine Anzahl anderer eingekreuzter mutierter Gene (*b*, *ml*, *Hu*, *Sy*) nicht verändert.

Die Vitalität wird durch *Mo* stark herabgesetzt.

Das häufigste Mosaikmerkmal ist halbseitige Aufhellung der Flügelbeschuppung, mit der in manchen Fällen eine Verdunkelung der Gegenseite verbunden ist.

In Heterozygoten spalten rezessive Gene halbseitig oder in Flecken oder Streifen auf den Flügeln heraus. Auch hierbei entspricht der Verminderung

eines Merkmals (Pigmentierung, Größe der Schuppen) in einem Bereich bisweilen die Verstärkung desselben Merkmals in dem angrenzenden anderen Bereich. Dieselbe Erscheinung tritt auch auf, wenn durch unbekannte Faktoren bewirkte Merkmale mosaikhafte auftreten.

Die Mosaikerscheinungen werden erklärt durch unregelmäßige Chromosomenverteilung in frühen oder späten Mitosen. Die *Mo*-Wirkung kann verschiedene Chromosomen, auch mehrere in einem Mosaikbezirk treffen.

Die Abänderung der Schuppengröße in den Mosaikfeldern in einem sehr weiten Bereich bei jeweils entsprechender Besetzungsdichte beweist, daß die Dimensionen des Epithelmusters von zahlreichen Faktoren abhängen, von denen einzelne mit bekannten Genen gekoppelt sind.

Auch die Pigmentmenge in den Schuppen von bestimmtem Formtypus ist polyfaktoriell bedingt.

Die mosaikhafte Ausfälle bestimmter Systeme des Zeichnungsmusters zeigen die genetische Selbständigkeit von Systemen im selben Sinne wie sie aus Modifikationsversuchen erschlossen wurde. In einer Reihe von Flügelmosaiks wird die Ausbreitung des Symmetriesystems stufenweise beschränkt, analog wie in Hitzereiz- und Brennversuchen.

Literatur

- BRIDGES, C. B.: Elimination of chromosomes due to a mutant (*minute-n*) in *Drosophila melanogaster*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **11**, 701 (1925a). — BRIDGES, C. B.: Haploidy in *Drosophila melanogaster*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **11**, 706 (1925b). — CREW, F. A., and ROWENA LAMY: Mosaicism in *Drosophila pseudo-obscura*. J. Genet. **37**, 211 (1939). — GEISSEL, H.: Entwicklungsdauer, Flügellänge und Vitalität ingezüchteter Mehlmottenstämme und Kreuzungen. Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **71**, 382 (1936). — KÜHN, A.: Entwicklungsphysiologische Wirkungen einiger Gene von *Ephestia kühniella*. Z. Naturwiss. **20**, 974 (1932). — Genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen an *Ephestia kühniella* Z. Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **67**, 197 (1934). — Über eine geschlechtsgekoppelte Mutation des Zeichnungsmusters (*dz*) bei *Ephestia kühniella* Z. Biol. Zbl. **59**, 347 (1939). — Über die Mutation *he* (gehemmte Ausfärbung) bei *Ephestia kühniella* Z. Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **77**, 337 (1939). — Vollständige Unterdrückung des Zeichnungsmusters durch eine Mutation der Mehlmotte *Ephestia kühniella*. Naturwiss. **27**, 597 (1939). — Zur Entwicklungsphysiologie der Schmetterlingsschuppen. Biol. Zbl. **61**, 109 (1941). — Die Ausprägung organischer Formen in verschiedenen Dimensionen und die Grundfragen der Entwicklungsphysiologie. Naturwiss. **31**, 373 (1943). — Über eine die Schuppenformbildung und Schuppenpigmentierung beeinflussende Mutation (*vd*) von *Ephestia kühniella*. Z. Biol. Zbl. **64**, 81 (1944). — Konstruktionsprinzipien von Schmetterlingsschuppen nach elektronenoptischen Aufnahmen. Z. Naturforsch. **1**, 348 (1946). — Der Faktor *ml* (musterlos) in Kombination mit anderen mutierten Faktoren von *Ephestia kühniella*. Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 580 (1956). — KÜHN, A., u. MELITTA V. ENGELHARDT: Über die Determination des Symmetriesystems auf dem Vorderflügel von *Ephestia kühniella*. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **130**, 660 (1933). — Elektronenoptische Untersuchungen über den Bau von Schmetterlingsschuppen. Biol. Zbl. **65**, 30 (1946). — KÜHN, A., u. K. HENKE: Genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen an der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z. Abh. Ges. Wiss. Göttingen, math.-phys. Kl. **15**, 1 (1929—1936). — KÜHN, A., u. DORE-LI WOYWOD: Unregelmäßige Chromosomenverteilung durch eine Mutation bei *Ephestia kühniella* Z. Z. Naturforsch. **1**, 38 (1946). — KÜHN, A., u. V. SCHWARTZ: Über eine weißäugige Mutante (*wa*) von *Ephestia kühniella*. Biol. Zbl. **62**, 226 (1942). — SCHWARTZ, V.: Eine neue Mutation des Zeichnungsmusters (*Us*) bei *Ephestia kühniella*. Biol. Zbl. **64**, 316 (1944). — SEEGER, HENRIETTE: Genetische Untersuchungen an der neuen letalen Mutation „Helles Umfeld“ (*Hu*) der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z. Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **86**, 545 (1955). — SENGÜN, A.: Über eine neue Mutation (kurzflügelig) und über die

Vitalitätsverhältnisse einiger Mutationsrassen der Mehlmotte *Ephesia kühniella* Z. Diss. Berlin 1939. — STERN, C.: Über Chromosomenelimination bei der Taufliche. Naturwiss. **15**, 740 (1927). — Somatic crossing over and segregation in *Drosophila melanogaster*. Genetics **21**, 625 (1936). — STUBBE, ANNA-ELISE: Die Wirkung verschiedener Reizungen mit erhöhter Temperatur auf das Zeichnungsmuster zweier Stämme der Mehlmotte *Ephesia kühniella* Z. Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **75**, 233 (1938). — STURTEVANT, A. H.: The *claret* mutant of *Drosophila simulans*: a study of chromosome elimination and of cell-lineage. Z. wiss. Zool. **135**, 323 (1929). — WAGNER, H. O.: Samen- und Eireifung der Mehlmotte *Ephesia kühniella* Z. Z. Zellforsch. **12**, 749 (1931). — WALD, HELENA: Cytological studies on the abnormal development of the eggs of the *claret* mutant type of *Drosophila simulans*. Genetics **21**, 264 (1936). — WHITING, P. W.: Genetic studies on the mediterranean flour-moth *Ephesia kühniella* ZELLER. J. exp. Zool. **28**, 413 (1919).

Prof. Dr. ALFRED KÜHN,

Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen/N, Spemannstr. 34

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn

ÜBER DAS AUFTRETEN TRIPOLARER SPINDELN UND MEHRKERNIGER POLLENMUTTERZELLEN IN ABREGULIERENDEN POLYPLOIDEN PFLANZEN

Von

W. GOTTSCHALK und N. HEIDE

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. Januar 1960)

A. Einleitung

In einer Reihe früherer Arbeiten wurden bei experimentell erzeugten tetraploiden Tomaten und solchen höherer Polyploidiestufen gesetzmäßige Abweichungen des meiotischen Teilungszyklus nachgewiesen, die auf das engste mit dem Problem der Herabregulierung der Chromosomenzahl in Verbindung stehen (GOTTSCHALK 1958 a und b, 1959). Die Allgemeingültigkeit der zunächst nur an wenigen Individuen erhaltenen Befunde konnte zumindest für das Objekt *Lycopersicon esculentum* durch die Bearbeitung einer großen Anzahl von Versuchspflanzen inzwischen erwiesen werden (GOTTSCHALK 1960). Auch während der prämeiotischen Mitosen laufen Vorgänge ab, die zur Genomsonderung und damit zur Bildung von Keimzellen mit der doppelt oder mehrfach reduzierten Chromosomenzahl führen können, die aber offenbar mit größeren Komplikationen behaftet sind als die entsprechenden Vorgänge in der Meiosis. Trotz einer Fülle cytologischer Einzelbefunde war es bisher noch nicht möglich, begründete Aussagen über die Mechanik der abweichenden meiotischen und prämeiotischen Vorgänge zu machen. In der vorliegenden Arbeit wird die Ausbildung tripolarer Spindeln in Verbindung mit gewissen Regulierungsmodi untersucht und damit ein Ansatz für das Verständnis der teilungsmechanischen Grundlagen des Abregulierungsphänomens gegeben. Daneben wird die Entstehung zwei- und mehrkerniger Pollenmutterzellen (PMZ) durch prämeiotische Abregulierungsvorgänge behandelt.

B. Material und Methode

Es wurden diploide und tetraploide Samen der Handelssorten „Immun“ und „Bonner Beste“ von *Lycopersicon esculentum* auf Colchicinagar nach SWAMINATHAN (1950) angekeimt und im Gewächshaus in sterilisierter Erde weitergezogen. In den jungen Blütenknospen tetra- und oktoploider Pflanzen wurden die Meiosis und die prämeiotischen Mitosen untersucht (Fixierung in Carnoy 3:1, Färbung mit Karmin-Essigsäure unter Eisenzusatz). Die Mikrophotographien wurden mit der Aufsetz-Kamera zum Stativ W von Zeiß-Winkel und zum Ortholux von Leitz hergestellt.

C. Empirischer Teil

1. Abregulierungserscheinungen in zweikernigen Pollenmutterzellen

Bei einigen oktoploiden Versuchspflanzen wurden bereits im Rahmen früherer Untersuchungen (GOTTSCHALK 1958 b) in geringer Häufigkeit PMZ gefunden, die schon in der meiotischen Prophase zwei völlig getrennte Kerne enthalten. Die

Meiosis verläuft in beiden Kernen normal, und es entstehen Gonen mit verminder-ten Chromosomenzahlen. Da diese Abweichung vom meiotischen Normalver-halten in einem engen Zusammenhang mit dem Phänomen der Abregulierung steht, wurde eine Erweiterung der bisherigen empirischen Befunde angestrebt. Die eben erwähnten Vorgänge konnten bei insgesamt 16 tetra- und höherploid- Versuchspflanzen erfaßt werden, es kann daher angenommen werden, daß es sich auch hierbei um wohl selten realisierte, aber doch allgemein verbreitete Prozesse handelt. Im gesamten neu bearbeiteten Material wurden 366 PMZ erfaßt, die bereits in der 1. Pro- und Metaphase zwei oder mehr selbständige Kerne enthielten; das Maximum lag bei 6 Kernen je Zelle. Die 366 Zellen schlüsseln sich wie folgt auf (die bereits früher publizierten Befunde sind hierbei nicht berück- sichtigt):

2 Kerne je PMZ: 316 Zellen	5 Kerne je PMZ: 4 Zellen
3 Kerne je PMZ: 39 Zellen	6 Kerne je PMZ: 2 Zellen
4 Kerne je MPZ: 5 Zellen	

Es sei zunächst näher auf die *zweikernigen* Gonotokonten eingegangen. Von den 316 verfügbaren Zellen konnten die Zahlenverhältnisse der Chromosomen in beiden Kernen bei 272 Gonotokonten zum Teil exakt, teils annäherungsweise ermittelt werden. In 221 der 272 auswertbaren Fälle besaßen die beiden Kerne gleiche, in den restlichen 51 Fällen unterschiedliche Chromosomenzahlen. Das Phänomen wurde sowohl in tetraploiden als auch in oktoploiden PMZ beobachtet, und zwar in den Stadien prämeiotischer Ruhekern bis MI. In *tetraploiden* PMZ sind entweder zwei diploide oder ein haploider und ein triploider Kern vorhanden. Entsprechende Befunde wurden an einigen wenigen *triploiden* Gonotokonten erhalten, die eine Chromosomenverteilung von $n + 2n$ in den beiden Prophase- kernen zeigten. Bei Zellen mit *höheren Polyploidiestufen* sind die Möglichkeiten der Genomsonderung theoretisch vielgestaltiger. Es wurden tatsächlich nahezu alle theoretisch denkbaren Verteilungen mikroskopisch auch gefunden. Am häufigsten traten zwei tetraploide Prophasekerne auf ($48 + 48$), seltener wurde die Sonderung in $24 + 72 (= 2n + 6n)$ beobachtet. In einer heptaploiden PMZ war eine Aufteilung in $24 + 60$ Chromosomen zustande gekommen ($= 2n + 5n$). In der Schemazeichnung (Abb. 1) sind noch einige andere Chromosomenvertei- lungen zusammengestellt, die mit in diese Gruppe hineingehören. In den betref- fenden Gonotokonten wurde jeweils das Stadium der 2. Metaphase mikroskopisch erfaßt, daraus ist die zugehörige meiotische Prophase rekonstruiert worden.

Abb. 1a zeigt zunächst eine zweikernige *pentaploide* Zelle mit den Valenzen $2n + 3n$. Im diploiden Kern sind in der 1. Anaphase geringfügige Verteilungs- störungen zustande gekommen, die in der Telophase zu den Chromosomenzahlen $11 + 13 (= n - 1) + (n + 1)$ führen. Im triploiden Kern ist die Reduktion normal im Sinne triploider PMZ verlaufen. Die Zelle ist ein Beispiel dafür, daß auch in abregulierenden Pflanzen in einem unbalancierten Gonotokonten durchaus nicht immer Ab- oder Einregulierungsvorgänge ablaufen; alle 8 Gonotokonten werden aneuploide Chromosomenzahlen besitzen und damit zu sterilen Pollen führen. Der umgekehrte Fall ist in Abb. 1b dargestellt. Auch diese PMZ ist aneuploid, sie besitzt in ihrer Gesamtheit mehr als 6 Genome, die in der Prophase in Form von 2 Kernen mit den Valenzen $2n$ und $> 4n$ vorliegen. Im diploiden Kern ver- läuft die Meiosis normal. Aus dem hypertetraploiden Kern wird jedoch im Ver-

lauf der 1. Anaphase ein Teilkomplex von 3 Genomen herausgesondert, während der Rest mit einer hyperhaploiden Chromosomenzahl an den 2. Spindelpol gelangt. Hier ist also in der 1. meiotischen Teilung eine Einregulierung der Chromosomenzahl aus einem unbalancierten in einen balancierten Zustand erfolgt. Wenn die Meiosis normal weiterläuft, werden von den 8 entstehenden Pollen 6 befruchtungsfähig sein.

Die Prophaseanordnung von $2n + 4n$ (Abb. 1c und 2) in *hexaploiden* Gonotokonten entspricht der Anordnung von $2n + 6n$ in oktoploiden Zellen, sie führt zu haploiden und diploiden Gonen. In *oktoploiden* PMZ wird neben der Prophasekombination von $4n + 4n$ häufig die eben erwähnte Anordnung von $2n + 6n$ gefunden. Während die Meiosis im diploiden Kern in der Regel normal verläuft, sind im hexaploiden Kern im Verlauf der 1. Anaphase gelegentlich an Stelle der normalen Reduktion

$6n \rightarrow 3n + 3n$ Genomsonderungen nach dem Prinzip
 $6n \rightarrow 2n + 4n$ und
 $6n \rightarrow n + 5n$ zu finden
 (Abb. 1d und e).

Ganz entsprechende Vorgänge sind in *hochpolyploiden* Gonotokonten mit Valenzen über 8n nachweisbar. So enthält eine Zelle mit 14 Genomen die Anordnung von $2n + 12n$ in der Prophase (Abb. 1f). Auch in dieser PMZ verlief die Meiosis nur im diploiden Kern normal, während im dodekaploiden

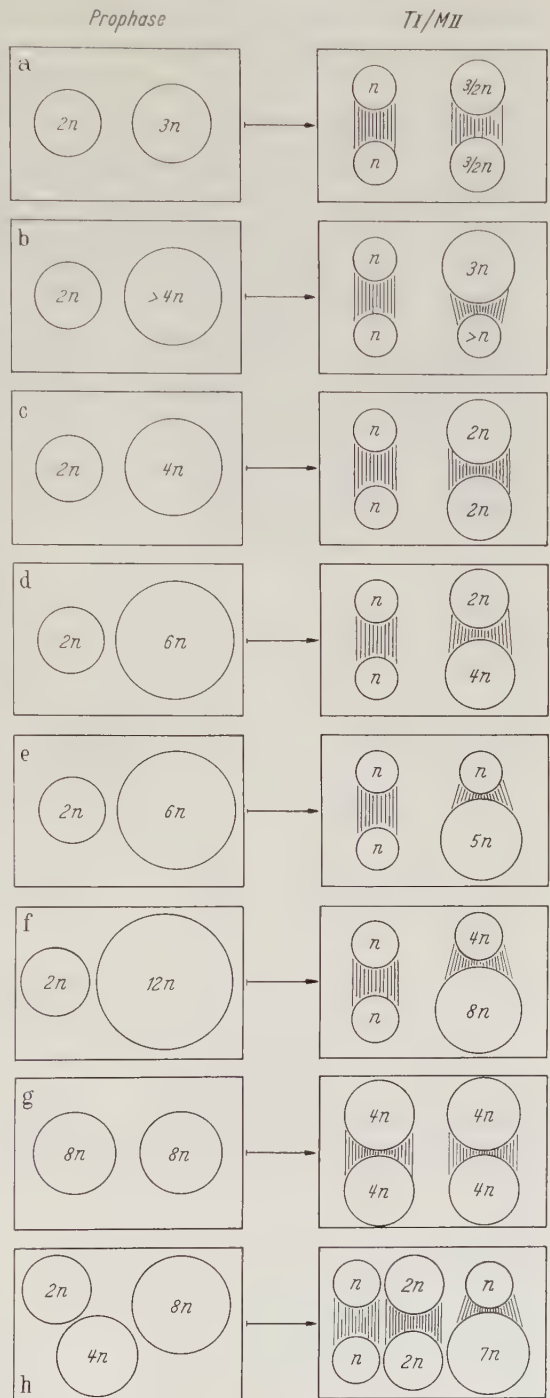


Abb. 1. Übersicht über die aufgefundenen Fälle von Genomsonderungen in hochpolyploiden zweikernigen PMZ. (Näheres im Text)

Kern nicht die erwartete Reduktion nach $6n + 6n$, sondern eine solche nach $4n + 8n$ zustande kam. Nach Abschluß der Meiosis werden in diesem Gonotokonten 4 haploide, 2 tetraploide und 2 oktaploide Gonen gebildet.



Abb. 2. 2. Metaphase einer ursprünglich zweikernigen PMZ der Versuchspflanze Nr. 1. Die Zelle war so groß, daß ihre beiden Hälften getrennt photographiert werden mußten (die Abbildungen überlappen sich in der Mitte, die 2. Platte von links ist zweimal abgebildet worden). Die linken beiden Äquatorialplatten besitzen je 12, die rechten beiden je 24 Chromosomen. Die Zelle ist somit hexaploid; es müssen bereits in der 1. meiotischen Prophase zwei getrennte Kerne mit den Valenzen $2n$ und $4n$ vorhanden gewesen sein. Die Zelle entspricht dem in der Schemazeichnung 11/c dargestellten Gonotokonten (1500fach)

In einigen wenigen 16-ploiden PMZ schließlich waren zwei oktaploide Prophasekerne vorhanden (Abb. 1 g). Die Aufteilung der hochchromosomigen euploiden Kerne derartiger Zellen lief nicht in allen Fällen mit voller Präzision ab, es traten gelegentlich zwei aneuploide Tochterkerne auf. In einigen Fällen war ganz offensichtlich keine genomatische Ordnung mehr vorhanden.

In den eben besprochenen Fällen sind nach Abschluß der 1. meiotischen Teilung 4 Kerne vorhanden, aus denen man in der Regel zuverlässig auf den Zustand in der vorausgegangenen Prophase rück schließen kann. Durch weitere Unregelmäßigkeiten können jedoch kompliziertere meiotische Bilder zustandekommen. So treten vereinzelt PMZ auf, die bereits in der 1. Telophase 6 Kerne besitzen. Sie gehen auf zweikernige Prophasen zurück, in beiden Kernen ist die Anaphaseverteilung der Chromosomen jedoch in Verbindung mit einer tripolaren Spindel erfolgt. Nach Abschluß der Meiosis werden in derartigen Fällen also 12 Gonen vorhanden sein, die infolge ihrer genomatischen Unbalance keine befruchtungsfähigen Keimzellen bilden können. In den Endstadien der Meiosis läßt sich häufig nicht feststellen, ob die hohe Gonenzahl innerhalb eines Gonotokonten auf einen zweikernigen Zustand in der Prophase oder auf tripolare Spindeln in der 1. oder 2. bzw. der 1. und 2. meiotischen Teilung zurückzuführen ist.

In denjenigen Gonotokonten, die in der Prophase *mehr als 2 Kerne* besitzen, liegen prinzipiell die gleichen Verhältnisse vor. Es handelt sich hierbei um Riesen-

zellen von häufig sehr abweichender Gestalt (Abb. 3 und 4), die schon morphologisch erkennen lassen, daß sie nicht nur als *mehrkernige*, sondern auch *mehrzellige* Gebilde aufzufassen sind, bei denen aus irgendwelchen Gründen die Zellwandbildung unterblieben ist. In der Regel läßt sich auch in derartigen Gebilden eine genomatische Ordnung feststellen. In *dreikernigen* tetraploiden Zellen ist im allgemeinen die Genomverteilung von $2n + n + n$, in oktoploiden Zellen diejenige von $4n + 2n + 2n$ verwirklicht. In den frühen Stadien der meiotischen Prophase bis einschließlich Pachytän lassen sich zwar keine exakten Chromosomenzählungen

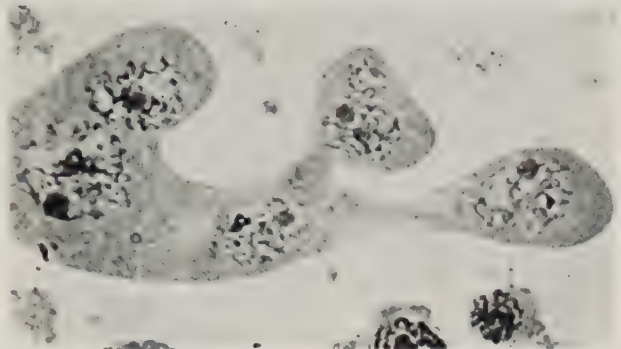


Abb. 3. Fünfkernige abnorm gestaltete PMZ der oktoploiden Versuchspflanze Nr. 15 (600fach)

durchführen, die Größenverhältnisse der Kerne und die annähernde Bestimmung der Chromosomenzahlen deuten jedoch häufig ein Verhältnis von 2:1:1 an. Bei der Versuchspflanze Nr. 15 trat eine PMZ auf, die in der 1. Metaphase 3 Äquatorialplatten mit den Valenzen $4n + 4n + 4n$ aufwies, es handelt sich also um eine dodekaploide Zelle. Schließlich wurde in der Versuchspflanze Nr. 21 eine PMZ mit insgesamt 14 Genomen gefunden, die in der Prophase in Form von 3 Kernen mit den Valenzen $2n + 4n + 8n$ vorlagen. Im diploiden und tetraploiden Kern verlief die Meiosis normal, die 8 Genome des oktoploiden Kernes wurden in der 1. Anaphase jedoch nicht nach $4n + 4n$, sondern nach $n + 7n$ reduziert (Abb. 1h). Es trat also auch hier die häufig zu beobachtende Tendenz in Erscheinung, aus einem hochpolyploiden Kern im Zuge einer atypisch verlaufenden meiotischen Reduktion ein Genom auszusondern.

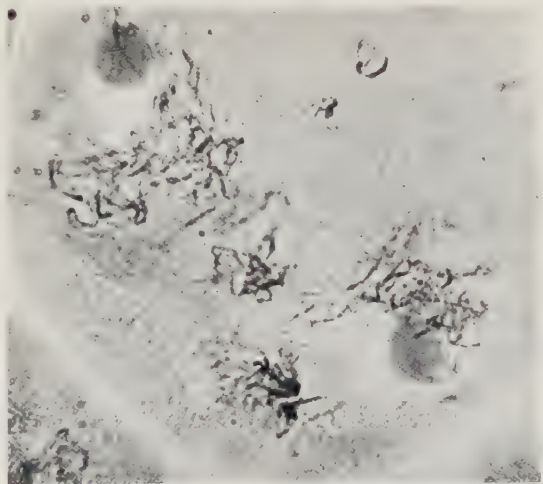


Abb. 4. Gonotokont mit 4 Pachytänkernen mit unterschiedlichen Chromosomenzahlen. Zumindest die beiden mittleren Kerne enthalten kein vollständiges Genom, denn sie besitzen keinen Nucleolus. Die Abregulierungsvorgänge, die dieser Kombination zugrundeliegen, haben also nicht zu genomatisch balancierten Verhältnissen geführt (750fach)

Auch die wenigen *vier- und fünfkernigen* Gonotokonten unseres Materials ließen zum Teil noch einen geordneten genomatischen Zustand erkennen. In einer derartigen Zelle waren in MI 4 Äquatorialplatten vorhanden, von denen 2 je 48 Chromosomen ($4n$) besaßen, die Chromosomenzahl der anderen beiden Platten konnte nicht ermittelt werden. In einem anderen Fall waren in MI $24 + 12 + 6 + 6$ Bivalente gebildet worden. Wenn in diesem Gonotokonten die Meiosis normal weiterläuft, so werden 16 Gonen entstehen, von denen

jedoch nur die vier 12-chromosomigen zur Bildung befruchtungsfähiger Keimzellen führen.

Schließlich sei noch näher auf einen Gonotokonten eingegangen, der 6 Pachytänkerne enthielt. Ihre Chromosomenzahlen entsprachen — soweit eine Beurteilung im Pachytän möglich ist — offenbar den Valenzen $4n + 4n + 2n + 2n + 2n + 2n$. Da bereits im Pachytän balancierte Verhältnisse vorliegen, wäre es theoretisch möglich, daß aus diesem Gonotokonten 24 befruchtungsfähige Pollen hervorgehen, von denen 8 die diploide und 16 die haploide Chromosomenzahl besitzen. Es ist dies der extremste Fall, der auf diesem Sektor in unserem Material auftrat. Inwieweit in allen Regionen einer derartigen Zelle, die wohl zutreffender als Zellverband anzusprechen ist, noch eine teilungsmechanisch ordnungsgemäße Meiosis ablaufen kann, kann freilich nicht entschieden werden. Die Bilder haben morphologisch eine gewisse Ähnlichkeit mit den vielkernigen, syncytienartigen Gebilden, die PRICE (1956) bei reinen Arten und Bastarden von *Saccharum* und *Erianthus* beobachtete und die durch Fusion von 3—7 Zellen entstanden sind. Sie treten jedoch in *diploiden* Organismen auf und führen

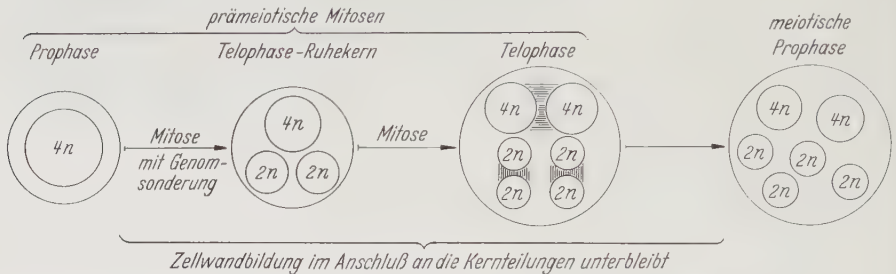


Abb. 5. Beispiel für die Bildung von 24 Gonon in einer hochpolyploiden PMZ durch Unregelmäßigkeiten im Verlauf der letzten prämeiotischen Mitose. (Näheres im Text)

zu polyploidieartigen Zuständen, stehen also nicht mit dem Abregulierungsproblem in Verbindung.

Man könnte das Zustandekommen der in unserem Material beobachteten Verhältnisse folgendermaßen deuten (Abb. 5): Da die Versuchspflanze Nr. 15 vorwiegend tetraploid war, sei von einer tetraploiden Archesporzelle ausgegangen. In Verbindung mit Genomsonderungen könnte im Verlauf einer der letzten prämeiotischen Mitosen der dreikernige Telophasenzustand von $4n + 2n + 2n$ entstanden sein (derartige Abnormalitäten sind in den Mitosen der Rattenleber häufig beobachtet worden (MARQUARDT und GLÄSS 1957)). Wenn wir nun annehmen, daß in dieser Archesporzelle die Zellwandbildung unterbleibt und alle vorhandenen Kerne eine neue Mitose durchlaufen, so muß der bereits bestehende Zustand verdoppelt werden, d. h. es entstehen 2 tetraploide und 4 diploide Kerne. Offenbar sind auch im Anschluß an diese Mitosen keine Zellwände gebildet worden, die nunmehr sechskernige Zelle ist vielmehr in dieser Form in die Meiosis eingetreten und wurde im Pachytän mikroskopisch erfaßt. Sie enthält insgesamt 16 Genome.

Außer den eben beschriebenen zweikernigen Gonotokonten wurden schließlich äußerst selten zweizellige Gonotokonten gefunden. Die Ausbildung einer Zellwand innerhalb der PMZ nach Abschluß der 1. meiotischen Teilung ist ja bei den Monocotyledonen weitverbreitet, bei den Dicotyledonen tritt sie selten auf, bei unserem Objekt *Lycopersicon esculentum* ist sie im allgemeinen nicht zu beobachten. In einer Anthere der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 16 wurden nun mehrfach Gonotokonten gefunden, die aus 2 Zellen bestehen. Die Chromosomenzahlen waren in allen analysierbaren Fällen in beiden Zellen gleich. Aus der Gonenzahl geht hervor, daß es sich in einigen Fällen um zweikernige PMZ gehandelt hat (Abb. 6). Da diese Unregelmäßigkeiten nur in Gonotokonten beobachtet wurden, die bereits die 2. meiotische Teilung durchliefen, ist wohl anzunehmen, daß die Wandbildung erst im Anschluß an die 1. meiotische Teilung erfolgt ist. Es traten

jedoch vereinzelt zweikernige PMZ mit *Prophasekernen* auf, die in der Mitte eine tiefe Einbuchtung, fast eine Durchschnürung zeigten. Es hat den Anschein, als sei in diesen Fällen nach der letzten prämeiotischen Mitose eine Trennung der beiden Zellhälften zu selbständigen Zellen angestrebt, aber nicht ganz erreicht worden. Derartige Bilder könnten als Stütze der oben formulierten Hypothese über die Entstehung mehrkerniger Gonotokonten betrachtet werden.

Die Kerne der mehrkernigen Gonotokonten durchlaufen die meiotischen

Stadien der Prophase zwar meist synchron, es ist dies jedoch nicht grundsätzlich der Fall. Es kommt vor, daß einer der beiden Kerne bereits in die Meiosis eingetreten ist, während der zweite noch im Stadium des prämeiotischen Ruhekerns verharret. Gelegentlich wurden im gleichen Gonotokonten ein Pachytän- und ein Diakinese Kern gefunden. Ähnliche Befunde erwähnen auch HOLDEN und MOTA (1956) für zweikernige PMZ von *Avena*-Bastarden sowie RIEGER (1958) für haploide Organismen von *Antirrhinum*. In dreikernigen Zellen unseres Materials wurde sogar mehrfach die Stadienfolge Pachytän/Diplotän/Diakinese beobachtet. Diese Beispiele können als weitere Hinweise dafür aufgefaßt werden, daß die Kerne innerhalb eines mehrkernigen Gonotokonten ein hohes Maß gegenseitiger Unabhängigkeit erreicht haben. Es sei noch erwähnt, daß die Bildung mehrkerniger Zellen auch im Verlauf der prämeiotischen Mitosen beobachtet wurde (Abb. 7).

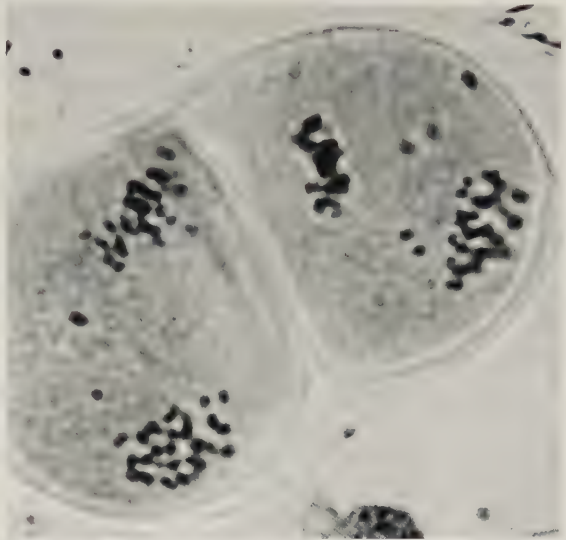


Abb. 6. Zweizelliger Gonotokont der oktaploiden Versuchspflanze Nr. 16. Die beiden Zellen durchlaufen die 2. Metaphase, die Anordnung geht also auf eine zweikernige PMZ zurück. Die Zellmembran ist wahrscheinlich nach Abschluß der 1. meiotischen Teilung eingezogen worden (1500fach)

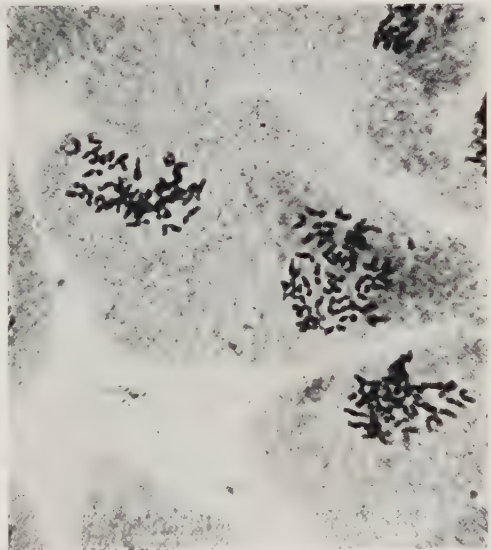


Abb. 7. Zweikernige Archesporzelle der oktaploiden Versuchspflanze Nr. 1. Die Zelle durchläuft die Metaphase einer prämeiotischen Mitose und besitzt 2 Äquatorialplatten mit je 48 Chromosomen (800fach)

Über die *Häufigkeit* des Auftretens mehrkerniger Gonotokonten seien folgende Angaben gemacht: In einer Anthere der oktaploiden Versuchspflanze Nr. 15 wurden 1200 PMZ ausgezählt, hiervon waren:

1001 einkernig, 173 zweikernig, 26 dreikernig.

Der Anteil mehrkerniger PMZ an der berücksichtigten Gesamtzahl lag mit 16,6% also recht hoch. Dieser Wert kann jedoch aus zweierlei Gründen nicht verallgemeinert werden. Zunächst war das Phänomen in der Versuchspflanze Nr. 15 ohnehin häufiger zu beobachten als bei anderen Pflanzen. Außerdem treten diese abweichend gestalteten Zellen in bestimmten Antherenregionen gehäuft auf, es ist eine Nesterbildung innerhalb der Anthere zu beobachten, die darauf hindeutet, daß die Bildung zweikerniger Gonotokonten nicht als Zufallsereignis, sondern als Reaktion von Zellgruppen auf spezifische Bedingungen anzusehen ist. Man wird also nur dann zuverlässige Werte über die Häufigkeit dieser Erscheinung erhalten, wenn man in einer größeren Antherenzahl für die Auswertung alle vorhandenen PMZ berücksichtigt. Das ist bei *Lycopersicon esculentum* sehr zeitraubend, weil die Anzahl der PMZ je Anthere bei tetraploiden Organismen in der Größenordnung von 5000—7000 liegt. Für eine Anthere der Versuchspflanze Nr. 15 ist diese Zählung vorgenommen worden. Die Anzahl einkerniger PMZ lag bei reichlich 5300, an mehrkernigen Gonotokonten wurden gefunden:

42 zweikernige PMZ,	2 fünfkernige PMZ,
5 dreikernige PMZ,	1 sechskernige PMZ
3 vierkernige PMZ,	

insgesamt also 53 mehrkernige Gonotokonten, das entspricht einem Anteil von rund 1 %. Bei Berücksichtigung einer größeren Antherenzahl würde man ohne Zweifel eine breitere Streuung dieser Werte erhalten.

2. Die Verteilung der Chromosomen aus tripolaren Spindeln

Bei der cytologischen Bearbeitung einer größeren Anzahl polyploider Tomaten, die zur Abregulierung neigten, wurden in relativ großer Häufigkeit PMZ gefunden, die nach Abschluß der 1. meiotischen Teilung nicht 2, sondern 3 Tochterkerne mit herabgesetzten Chromosomenzahlen enthielten. Es lag nahe, hierbei die Mitwirkung einer tripolaren Spindel anzunehmen und an Hand der empirischen Befunde zu prüfen, ob ein innerer Zusammenhang zwischen dem Phänomen der meiotischen Abregulierung und der Anwesenheit tripolarer Spindeln besteht. Wäre dies der Fall, so müßten in derartigen Zellen bevorzugt Kerne mit *euploiden*, und zwar zum Teil mit abregulierten Chromosomenzahlen auftreten. Steht die tripolare Spindel hingegen nicht mit der Abregulierung in Verbindung, so müßten alle 3 Telophasenkerne *aneuploide* Chromosomenzahlen besitzen, denn es werden im Falle der tetraploiden Tomate 48 Chromosomen ($=4n$) auf 3 Tochterkerne verteilt. Es sind also Chromosomenzahlen zu erwarten, die nach zufallsgemäßer Verteilung zwischen 12 und 24 je Kern liegen müßten.

Für die Bearbeitung dieser Fragestellung wurden nur PMZ verwendet, bei denen die tripolare Spindel oder Reste davon mikroskopisch noch erkennbar waren (Abb. 8—11). Es bestand für diese Zellen also kein Zweifel, daß die Bildung von 3 Telophasekernen tatsächlich unter Mitwirkung einer tripolaren Spindel

abgelaufen war. In einigen dieser Gonotokonten war es möglich, die Chromosomenzahlen der 3 Tochterkerne zu bestimmen. Wenn wir zunächst nur die 56 auswertbaren, rein tetraploiden PMZ unseres Materials berücksichtigen, so ergeben sich die in der nachstehenden Tabelle zusammengestellten chromosomalen Verhältnisse.

Tabelle. Die Chromosomenverteilung in der 1. meiotischen Anaphase bei Anwesenheit einer tripolaren Spindel

Gruppe	Chromosomenverteilung in TI	Tetra- ploide PMZ	Aneu- ploide PMZ	Summe
I	Einer der 3 Telophasekerne euploid			
	12 Chromosomen	9	2	
	24 Chromosomen	10	4	
	Gesamtzahl der PMZ.	19	6	25
II	Grenzfälle:			
	11, 13 Chromosomen	12	2	
	22, 23, 25, 26 Chromosomen.	4	1	
	Gesamtzahl der PMZ.	16	3	19
III	Alle 3 Telophasekerne aneuploid.	21	6	27
	Gesamtzahl aller berücksichtigten PMZ.	56	15	71

Es zeigt sich zunächst, daß bei einem Drittel der analysierten *tetraploiden* PMZ einer der 3 nach Abschluß der 1. meiotischen Teilung vorhandenen Kerne 12 oder 24 Chromosomen — also die haploide oder die diploide Chromosomenzahl — besaß (z. B. Anaphasenverteilung von 12 + 17 + 19, 24 + 17 + 7

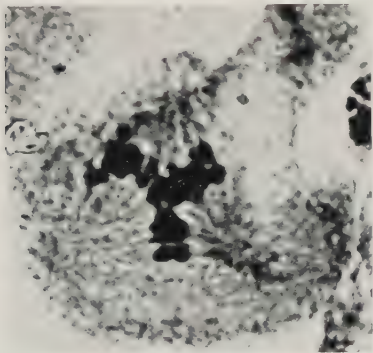


Abb. 8

Abb. 8. Tripolare Spindel in der 1. meiotischen Metaphase (tetraploide Versuchspflanze Nr. 16; 2000fach)

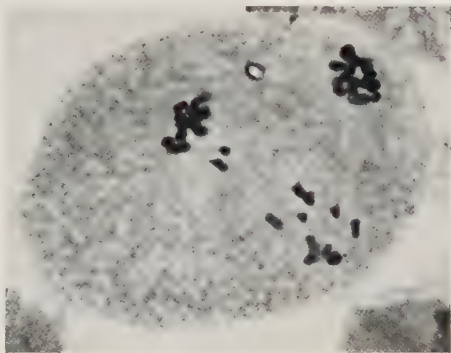


Abb. 9

Abb. 9. Die Bildung von 3 Telophasekernen in Verbindung mit einer tripolaren Spindel, die im Mikrophoto noch gut erkennbar ist (tetraploide Versuchspflanze Nr. 19; 1200fach)

oder ähnliche Kombinationen). Bei weiteren 16 PMZ traten in jeweils einem der fraglichen 3 Kerne Chromosomenzahlen auf, die nur wenig von den beiden euploiden Zahlen abweichen (11 oder 13 bzw. 22,23 oder 25,26 Chromosomen). Die Chromosomenzahl ist wegen der mangelhaften Übersichtlichkeit der Kerne nicht immer exakt feststellbar, es ist also damit zu rechnen, daß einige Zellen der 2. Gruppe eigentlich der 1. Gruppe zuzuordnen sind. Die 3. Möglichkeit, die

Bildung von 3 aneuploiden Tochterkernen in der 1. Telophase (etwa $14 + 16 + 18$), wurde nur in 21 der 56 verfügbaren Gonotokonten aufgefunden ($= 37,5\%$). Bei den wenigen *aneuploiden* PMZ, in denen die Anwesenheit tripolarer Spindeln nachgewiesen werden konnte, liegen die gleichen Verhältnisse vor (Tabelle rechts). Auch hier trat in einem hohen Anteil aller tripolaren Zellen in der Telophase jeweils ein euploider Kern auf, es kam z. B. in einer hypotetraploiden Zelle die Anaphasenverteilung von $24 + 14 + 4$, in einer hypertetraploiden PMZ diejenige von $24 + 20 + 16$ zustande. Von besonderem Interesse waren 3 PMZ, in denen aus einem chromosomal unbalancierten Zustand durch die Mitwirkung einer tripolaren Spindel offenbar balancierte Verhältnisse geschaffen wurden. So kam in einer 39-chromosomigen (also hypotetraploiden) PMZ der Versuchspflanze Nr. 18/57 nicht die erwartete normale Anaphasenverteilung von etwa $20 + 19$, sondern die tripolare Verteilung von $12 + 12 + 15$ ($= n + n + > n$) zustande. In der gleichen Anthere war eine heptaploide PMZ mit 84 Chromosomen vorhanden, in der eine Anaphasenverteilung von $12 + \sim 24 + \sim 48$ ($= n + 2n + 4n$) erfolgte, die Chromosomenzahlen in den beiden hochchromosomigen Kernen waren nicht exakt zu ermitteln. Schließlich wurde in der oktoploiden Versuchspflanze Nr. 75/1956 eine PMZ gefunden, die in der 1. Telophase die Verteilung von $24 + 24 + 36$, also die Kombination von $2n + 2n + 3n$ zeigte.

Bei Berücksichtigung aller diesbezüglichen Befunde enthielt in 25 von 71 analysierbaren tripolaren PMZ einer der 3 Telophasenkerne die haploide oder diploide Chromosomenzahl, in weiteren 19 Fällen eine Zahl, die nur geringfügig von der haplo- oder diploiden Valenz abweicht. Nur in 27 Gonotokonten ($= 38,0\%$) traten 3 aneuploide Kerne auf. Selbst wenn man annimmt, daß dieser Wert durch einige Grenzfälle der 2. Gruppe noch etwas erhöht wird, liegt die Anzahl der PMZ der 1. Gruppe (die durch Zellen der 2. Gruppe noch ergänzt werden muß; s. oben) weit über dem Erwartungswert für eine zufällige Chromosomenverteilung. Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, daß in Zellen mit tripolaren Spindeln eine gewisse Tendenz zur Bildung euploider Kerne vorhanden ist. Es hat somit den Anschein, als stünde die Anwesenheit einer tripolaren Spindel mit dem Phänomen der Ab- bzw. Einregulierung der Chromosomenzahl in Verbindung. Diese Schlüsse sind natürlich nur unter der Voraussetzung berechtigt, daß die 12- bzw. 24-chromosomigen Kerne vollständige Genome enthalten. Einige beweiskräftige Befunde, die diese Annahme rechtfertigen, sind kürzlich publiziert worden (GOTTSCHALK 1960).

In der Tabelle sind nur diejenigen Zellen berücksichtigt, bei denen in der ersten meiotischen Anaphase eine tripolare Spindel zur Ausbildung gekommen war (Abb. 8 und 9). In geringerer Häufigkeit trat diese Anomalie auch in der zweiten Teilung auf, und zwar entweder nur in einer (Abb. 10) oder in beiden Tochterkernen der PMZ (Abb. 11), ein Hinweis darauf, daß die beiden Teile des Gonotokonten nach Abschluß der 1. meiotischen Teilung bereits eine gewisse Selbständigkeit und gegenseitige Unabhängigkeit erreicht haben. Im ersten Fall werden 5 Gonen gebildet, von denen 2 die gleiche Chromosomenzahl besitzen (die aus der bipolaren Spindel entstandenen Kerne), im zweiten Fall entstehen 6 Gonen, die meist verschiedene Chromosomenzahlen aufweisen. Es ist auf diese Weise möglich, noch in der 2. Interphase zu erkennen, ob die 6 vorhandenen Gonen in Verbindung mit *einer* tripolaren Spindel in der 1. oder mit *zwei* tripolaren Spindeln in der 2. meiotischen Teilung zustande gekommen sind, denn im letzteren Fall können die 6 Kerne in 3 Zweiergruppen unterteilt werden, wobei die Chromosomenzahl der beiden Kerne einer jeden Gruppe jeweils gleich ist.

Pollenmutterzellen mit zwei tripolaren Spindeln in der 2. meiotischen Teilung traten wesentlich seltener auf als Gonotokonten mit einer bi- und einer tripolaren Spindel. Ins-

gesamt wurden 86 PMZ mit derartigen Anomalien erfaßt, von denen 29 der 1. und 57 der 2. Gruppe zuzuordnen sind. In einigen Fällen wurden auch in der 2. Teilung in Verbindung mit tripolaren Spindeln Kerne mit der diploiden Chromosomenzahl gebildet, das empirisch auswertbare Material war jedoch für den Vergleich mit den oben geschilderten Verhältnissen der 1. meiotischen Teilung zu gering.

Abschließend sei noch näher auf eine interessante PMZ der oktaploiden Versuchspflanze Nr. 75 eingegangen (Abb. 11). In der fraglichen Zelle war jede der beiden Äquatorialplatten der 2. Metaphase in 2 Teilplatten mit unterschiedlichen Chromosomenzahlen aufgegliedert. Die untere Gruppe der rechten Platte enthält

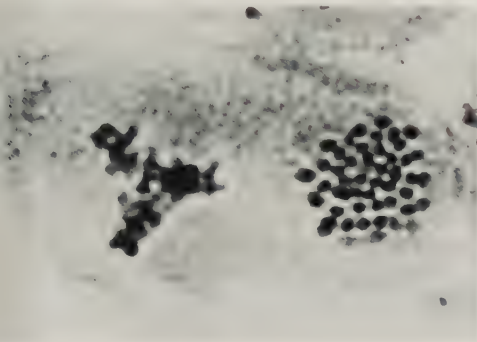


Abb. 10

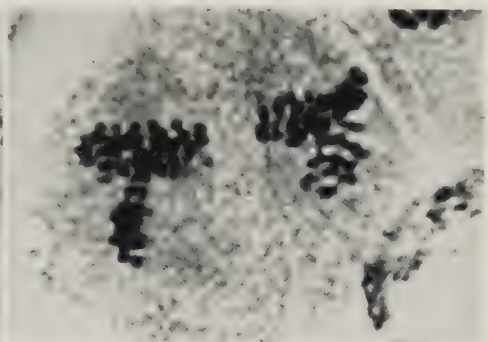


Abb. 11

Abb. 10. Eine bipolare und eine tripolare Spindel in der 2. Metaphase einer PMZ der oktaploiden Pflanze Nr. 17. In der Zelle werden 5 Gonen gebildet (1800fach)

Abb. 11. Zwei tripolare Spindeln in der 2. Metaphase einer PMZ der oktaploiden Pflanze Nr. 75; es entstehen 6 Gonen. Die untere Chromosomengruppe der rechten Platte besteht aus 12 Chromosomen. In den anderen Teilplatten ist die Chromosomenzahl zwar nicht feststellbar, es ist aber möglicherweise in beiden Äquatorialplatten eine Genomsonderung nach $n+3n$ zustande gekommen. (Näheres im Text; 1800fach)

12 Chromosomen, also die haploide Chromosomenzahl. Da die Gesamtzahl der rechten Äquatorialplatte bei 48 ($=4n$) liegen muß, ist hier also offenbar eine Trennung der 4 vorhandenen Genome in 2 Partien mit den Valenzen $n+3n$ zustande gekommen. In der linken Äquatorialplatte sind die Chromosomen zwar nicht zählbar, es scheinen aber die gleichen Verhältnisse vorzuliegen. Würde die Meiosis in diesem Gonotokonten normal weiterlaufen, so entstünden 4 haploide und 4 triploide Gonen. In beiden Hälften der PMZ wurden jedoch tripolare Spindeln gebildet, und es ist kaum anzunehmen, daß die Verteilung der Spalt-hälften aus 2 Teilplatten mit den Valenzen $n+3n$ innerhalb einer tripolaren Spindel zu chromosomal balancierten Gonen führt. Dieses Beispiel zeigt, daß in einer PMZ durch den Ablauf von Genomsonderungen wohl die Voraussetzungen für eine geregelte Abregulierung geschaffen werden können, daß sie aber durch eine zusätzliche meiotische Abnormalität — im vorliegenden Fall durch das Auftreten tripolarer Spindeln — nicht wirksam wird.

D. Theoretischer Teil

1. Die Beziehungen zwischen der meiotischen Abregulierung und der Anwesenheit tripolarer Spindeln

Aus dem 2. Abschnitt der vorliegenden Arbeit geht hervor, daß zwischen dem Ablauf bestimmter Regulierungsprozesse und der Anwesenheit tripolarer

Spindeln möglicherweise gewisse Beziehungen bestehen. Es wäre z. B. denkbar, daß einer der häufigsten meiotischen Regulierungsprozesse — die Bildung von 3 Kernen mit den Valenzen $2n + n + n$ in TI bzw. MII tetraploider PMZ — unter der Mitwirkung tripolarer Spindeln verläuft¹. Diese sehr naheliegende Annahme konnte jedoch noch nicht endgültig bestätigt werden. Bei den bisher untersuchten Fällen der Chromosomenverteilung aus tripolaren Spindeln enthielt jeweils nur einer der 3 Telophasekerne die ab- oder einregulierte Chromosomenzahl, es ist also nur ein *teilweise* balancierter Zustand erreicht worden. Der eben erwähnte Abregulierungsmodus hingegen führt in allen 3 Kernen zu euploiden Chromosomenzahlen: es wird ein chromosomal *völlig* balancierter Zustand erreicht. Das

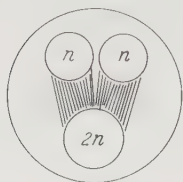


Abb. 12. Schematische Darstellung des meiotischen Abregulierungsmodus $2n + n + n$ in der 1. Telophase in Verbindung mit einer „gespaltenen“ Spindel

Charakteristikum dieser Zellen besteht neben den spezifischen genomatischen Verhältnissen vor allem darin, daß am Ende der 1. meiotischen Teilung nicht die normale Zwei-, sondern eine Dreipoligkeit der PMZ realisiert ist, die zwanglos durch die Mitwirkung einer tripolaren Spindel erklärt werden könnte.

Die Kombination von $2n + n + n$ wurde vorwiegend in der 2. Metaphase erfaßt, in einem Stadium also, in dem die Gestaltung der Spindel der 1. meiotischen Teilung nicht mehr unmittelbar bearbeitet werden kann. Bis jetzt konnte die Anwesenheit einer tripolaren Spindel in derartigen PMZ noch in keinem

Falle sicher nachgewiesen werden. Ich habe daher in einer früheren Publikation (GOTTSCHALK 1958a, Abb. 20) den Standpunkt vertreten, die Genomsonderung könne auch mit einer einseitigen *Spaltung* der ursprünglich vorhandenen bipolaren Spindel verbunden sein. Es würde dadurch erst sekundär eine Tripolarität der Spindel erreicht. Inzwischen haben wir einige Befunde erhalten, die als Stütze dieser Hypothese aufgefaßt werden können. So wurden in der tetraploiden Versuchspflanze Nr. 934 mehrfach PMZ gefunden, die in der 1. Telophase 3 Kerne mit den Valenzen $2n + n + n$ besaßen, ohne daß eine tripolare Spindel vorhanden war. Die Gestaltung der Spindel zeigte in all diesen Fällen den in Abb. 12 schematisch dargestellten Bau. Das entscheidende Merkmal dieser Zellen lag darin, daß die beiden haploiden Kerne wohl durch je eine Spindel mit dem diploiden Kern, daß sie aber niemals untereinander verbunden waren, wie das bei typischen tripolaren Spindeln stets der Fall ist. Diese Bilder entsprechen durchaus der theoretischen Vorstellung, die ich in der eben zitierten Arbeit vertreten habe, die Anzahl der Befunde ist jedoch noch zu gering, um bereits eine Entscheidung treffen zu können. Die Hauptaufgabe der weiteren Bearbeitung des Abregulierungsproblems wird also vor allem in der Klärung des teilungsmechanischen Ablaufs dieser Prozesse liegen. Leider ist das in cytologischer Beziehung so günstige Objekt *Lycopersicon esculentum* für die Bearbeitung dieser Fragestellung wenig geeignet.

¹ Diese meiotische Verteilung darf nicht mit der Kombination von $2n + n + n$ verwechselt werden, die STOREY (1956) bei einigen Orchideen in der 2. *Telophase diploider* PMZ gefunden hat. Der diploide Kern ist ein Restitutionskern, die beiden haploiden Kerne entstehen in Verbindung mit einem normalen meiotischen Stadienablauf. Während in diesem Fall Gonon mit erhöhter Chromosomenzahl gebildet werden, liegt das Charakteristikum unserer Beispiele gerade umgekehrt in der *übernormalen Reduktion* der Chromosomenzahl.

In der Literatur liegen zwar vielfach Angaben über das Auftreten tri- und multipolarer Spindeln in der Mitose und Meiosis vor, die Untersuchungen wurden aber entweder an diploiden oder an natürlichen polyploiden Objekten, an Bastarden sowie an tierischen Organismen vorgenommen, sind daher nicht streng mit unseren Befunden vergleichbar und geben — soweit die zahlenmäßige Verteilung der Chromosomen in den multipolaren Anaphasen überhaupt erfaßt werden konnte — keine Auskunft über unsere Fragestellung. Es sind in diesem Zusammenhang die Arbeiten von YAMANOUCHI (1909), HEITZ (1925a und b), MICHAELIS (1926), BLEIER (1930), PERCIVAL (1930), KNIEP (1931), SMITH (1935), SASS (1938), YAMAHA und UEDA (1939), SWANSON und NELSON (1942), KHAN (1951), KANÔ (1952), YOSIDA (1954), NAMBIAR (1955), SNOAD (1955) und POHLENDT (1958) zu nennen; weitere Angaben bei TUSCHLER (1951). Es sei jedoch betont, daß bereits MARQUARDT und GLÄSS (1957) die in der Rattenleber auftretenden multipolaren Spindeln mit dem Phänomen der Genomsonderung in Verbindung bringen. Nach GLÄSS (1957) ist ihre Häufigkeit allerdings zu gering, als daß man das Auftreten der Genomsonderungen generell damit erklären könnte. Fälle echter Abregulierung, die mit Spindelanomalien korreliert sind, erwähnt bereits v. WETTSTEIN (1927) für tetraploide Sippen von *Funaria hygrometrica*. Durch vierpolige Spindeln werden an Stelle von 4 diploiden 8 haploide Gonen gebildet. Es entsteht also ein Effekt, der in unserem Material sowohl bei autotetraploiden als auch bei oktoploiden Pflanzen vielfach beobachtet wurde, ohne daß wir als Ursache hierfür Spindelanomalien unmittelbar nachweisen konnten.

Schließlich müssen in diesem Zusammenhang nochmals die Befunde von VAARAMA (1949) an *Wurzelspitzen* der Nachkommen einer tetraploiden Pflanze von *Ribes nigrum* erwähnt werden. Der Autor beobachtete in Verbindung mit einer Teilung der Spindel „double-plate-metaphases“, als deren Folge nach Abschluß der Mitose 4 Tochterkerne mit herabgesetzten Chromosomenzahlen entstehen. Im Zuge dieser Vorgänge kommt in der Metaphase häufig eine Aufgliederung der tetraploiden Chromosomenzahl in zwei gleiche oder annähernd gleiche Partien zustande. Diese Befunde entsprechen morphologisch weitgehend unseren in der 1. meiotischen Metaphase gefundenen Bildern. VAARAMA rechnet jedoch aus Gründen teilungsmechanischer Schwierigkeiten nicht mit einer Aufgliederung nach vollständigen Chromosomensätzen, sieht in seinen abweichenden Metaphasebildern vielmehr das Ergebnis zufälliger Verteilungsvorgänge. Fälle einer möglicherweise geordneten somatischen Reduktion ohne Mitwirkung der Spindel sind kürzlich von RISLER (1959) für endomitotische Zellen der Larvenepidermis von *Aedes* beschrieben worden. Hier ordnen sich die Chromosomen in der Metaphase tetraploider Zellen in der Spindellängsachse paarweise übereinander und weichen „vermutlich“ paarweise auseinander. Als Folge davon treten Tochterzellen mit der reduzierten Chromosomenzahl auf.

2. Die mehrkernigen Pollenmutterzellen

Zwei- und mehrkernige Zellen sind sowohl für tierische als auch für pflanzliche Organismen in der Literatur vielfach beschrieben worden. Für die Rattenleber werden sie von MÜNZER (1925), BEAMS und KING (1942), AUBIN und BUCHER (1952), BUCHER (1953), GLÄSS (1957), MARQUARDT und GLÄSS (1957), für tumortragende Ratten und Mäuse von KANÔ (1952) und YOSIDA (1954) erwähnt. Bei pflanzlichen Objekten treten sie teils spontan (MATSUURA und OKUNO 1943, HOLDEN und MOTA 1956, PRICE 1956, RIEGER 1958), teils nach Einwirkung bestimmter Chemikalien (SAKAMURA 1920, YAMAHA 1927, SASS 1938, SIGENAGA 1944) oder nach Röntgenbestrahlung auf (v. KREYBIG 1959). Soweit in den eben angeführten Arbeiten Chromosomenzählungen vorgenommen wurden, entsprechen die Chromosomenzahlen eines jeden der beiden Kerne in der Regel der normalen Chromosomenzahl des betreffenden Gewebes, es ist offenbar die Membranbildung nach Abschluß einer Mitose ausgeblieben. Es wird dadurch ein Zustand erreicht, der etwa dem Normalzustand der Tapetenzellen vor Eintritt in die Endomitosen entspricht. Derartige Zellen wurden in unserem Material auch beobachtet, es traten in oktoploiden Antheren PMZ mit 2 oktoploiden Ruhekernen auf, die gemeinsam in die Meiosis eintraten und zusammen 8 tetraploide Gonen bildeten (Abb. 13a). Derartige Vorgänge stehen nicht mit dem Phänomen der Abregulierung in Verbindung, denn die Chromosomenzahl der Gonen entspricht der Normalzahl oktoploider Pflanzen.

Wesentlich häufiger wurden in den Antheren unserer oktoploiden Versuchspflanzen jedoch zweikernige PMZ gefunden, deren Kerne *zusammen* die

oktoploide Chromosomenzahl enthielten (vgl. auch GOTTSCHALK 1958 b). In diesen Fällen muß also zunächst einmal in Verbindung mit einem Abregulierungsprozeß die Aufgliederung der 8 vorhandenen Genome in 2 Partien nach dem Schema $4n + 4n$, $2n + 6n$, $3n + 5n$ oder $n + 7n$ erfolgen. Der zweikernige Zustand derartiger Zellen kann nicht mit Unregelmäßigkeiten in der Membranbildung in Zusammenhang gebracht werden. Da wir nicht nur mehrkernige *meiotische* Pro- und Metaphasen, sondern auch PMZ mit mehreren *prämeiotischen* Ruhekernen gefunden haben, kommt die Aufgliederung der vorhandenen Genome in zwei oder mehr Partien schon während der prämeiotischen Mitosen zustande; die den mehrkernigen PMZ unseres Materials zugrunde liegenden Prozesse sind somit der Gruppe der prämeiotischen Abregulierungsvorgänge zuzuordnen. Bei der oktoploiden Versuchspflanze Nr. 1/57 konnten diese Vorgänge mikroskopisch unmittelbar erfaßt werden: Es traten nicht nur prämeiotische Zellen mit zwei gleich- oder ungleich großen Ruhekernen, sondern auch zweikernige Pro- und Metaphasen *mit einer bereits reduzierten Chromosomenzahl auf* (Abb. 7).

In Abb. 13 sind verschiedene Möglichkeiten der Entstehung mehrkerniger PMZ aus oktoploiden Archesporzellen in Verbindung mit Abregulierungsvorgängen schematisch dargestellt. Das Ergebnis der Genomsonderung nach Ablauf einer prämeiotischen Mitose ist aus der mittleren Rubrik der Abbildung ersichtlich, wobei in diesem Zusammenhang nicht näher diskutiert werden soll, wie die angegebenen Telophasekombinationen teilungsmechanisch zustande kommen. Es kann sowohl aus den Befunden an Mitosen der Rattenleber (MARQUARDT und GLÄSS 1957, GLÄSS 1957) als auch aus unseren prämeiotischen und meiotischen Befunden als sicher angenommen werden, daß die eingezeichneten Endstadien der Teilung als Folge atypisch verlaufener Mitosen wirklich zustande kommen. Aus der prämeiotischen Telophasekombination $8n + 4n + 4n$ können im weiteren Verlauf der Antherenentwicklung PMZ verschiedener Polyploidiestufen und unterschiedlicher Konstitution entstehen: Kommt im Anschluß an die letzte prämeiotische Mitose eine Membranbildung in der in Abb. 13b dargestellten Weise zustande, so entstehen eine normale oktoploide und eine zweikernige oktoploide PMZ, deren Kerne die Valenzen $4n + 4n$ besitzen. Gonotokonten dieser genomatischen Konstitution waren in den Antheren unserer oktoploiden Versuchspflanzen häufig zu beobachten. Unterbleibt die Membranbildung, so entsteht eine dreikernige, 16-ploide PMZ mit den Valenzen $8n + 4n + 4n$ (Abb. 13c). Führt die Genomsonderung in der oktoploiden Archesporzelle nicht zu 3, sondern zu 4 Kernen, so werden zweikernige oktoploide PMZ entstehen, wenn die Membranbildung zustande kommt; unterbleibt sie, so entsteht eine vierkernige 16-ploide PMZ (Abb. 13d und e). Mehrkernige Gonotokonten mit Valenzen über $8n$, die in Verbindung mit derartigen Vorgängen entstanden sein könnten, wurden vereinzelt aufgefunden.

Das Charakteristikum aller dieser Vorgänge liegt darin, daß offenbar in der letzten prämeiotischen Mitose ein Abregulierungsprozeß stattfindet, der bei allen oder bei einem Teil der Tochterkerne der betreffenden Archesporzelle eine prämeiotische Reduktion der Chromosomenzahl herbeiführt. Im Anschluß an diesen Vorgang tritt die Zelle in die Meiosis ein. Bei einem präzisen Stadienablauf wird in den eben genannten bereits reduzierten Kernen die normale meiotische Reduktion der Chromosomenzahl als *zweiter* Reduktionsvorgang ablaufen, der dafür sorgt, daß die entstehenden Gonen nicht die einfache, sondern die doppelt reduzierte Chromosomenzahl — im Falle einer oktoploiden Archesporzelle also die diploide — erhalten.

Es müßte jetzt noch eine Erklärung für das Zustandekommen dreikerniger, oktoploider PMZ mit den Valenzen $4n + 2n + 2n$ gefunden werden. Unter allen

entwicklung in Verbindung mit einer prämeiotischen Reduktion aus oktoploiden Archesporzellen zunächst tetraploide entstehen müßten, in denen dann die eben geschilderten Vorgänge ablaufen können. Es wären für die Entstehung dreikerniger oktoploider Gonotokonten also zwei prämeiotische Reduktionsprozesse notwendig. Diese durch Zusatzhypothesen belastete Interpretation erfährt insofern eine recht wesentliche Stütze, als die gleichen oktoploiden Gonotokonten vereinzelt auch in *tetraploiden* Antheren aufgefunden wurden, dort also mit Sicherheit auf tetraploide Archesporzellen zurückzuführen sind. Gerade aus diesem Befund geht die unerwartete Kompliziertheit dieser Vorgänge anschaulich hervor: Es entstehen durch anomale Kern- und Zellteilungen in einer tetraploiden Anthere zunächst oktoploide Gonotokonten, in denen jedoch diploide und haploide Gonen und damit Gameten gebildet werden. Der Gonotokont in seiner Gesamtheit erfährt also eine Polyploidisierung, als Ergebnis der Meiosis treten jedoch Kerne mit der einfach und doppelt reduzierten — also herabregulierten — Chromosomenzahl auf.

Wenn die beiden entscheidenden Abnormalitäten — die Genomsonderung und das Ausbleiben der Membranbildung — gemeinsam auftreten, so können sie PMZ mit einer noch größeren Kernzahl zustande bringen. Ein derartiger Fall, nämlich die Entstehung einer sechskernigen PMZ, ist in Abb. 5 an Hand der empirischen Befunde rekonstruiert und schematisch dargestellt worden. Es sei noch erwähnt, daß das Auftreten von 2 oder 3 Äquatorialplatten in der 1. meiotischen Metaphase nicht unbedingt auf prämeiotische Genomsonderungen zurückgehen muß, es wäre auch denkbar, daß entsprechende Vorgänge in der meiotischen Prophase ablaufen.

Zusammenfassung

1. In den Antheren experimentell erzeugter tetra- und oktoploider Pflanzen von *Lycopersicon esculentum* treten in geringer Häufigkeit zwei- und mehrkernige PMZ auf, die in Verbindung mit prämeiotischen Abregulierungsvorgängen entstehen. Die Kerne besitzen teils gleiche, teils unterschiedliche Chromosomenzahlen innerhalb der gleichen Zelle, wobei alle im Sinne der Abregulierung theoretisch denkbaren Möglichkeiten mikroskopisch erfaßt werden konnten. In den fraglichen Gonotokonten können in Abhängigkeit vom Polyploidiegrad bis zu 24 Gonen verschiedener Valenzen entstehen.

2. Die Einzelkerne mehrkerniger Gonotokonten durchlaufen die meiotischen Stadien meist synchron. Gelegentlich treten innerhalb der gleichen PMZ Pachytän- und Diakinesekerne auf; die Einzelkerne haben also einen gewissen Grad gegenseitiger physiologischer Unabhängigkeit erreicht.

3. In einigen PMZ vieler Versuchspflanzen kamen in beiden meiotischen Teilungen tripolare Spindeln zur Ausbildung. In diesen Zellen war trotz der Tripolarität in der 1. Telophase die Tendenz zur Bildung niedrigchromosomiger, aber *euploider* Kerne erkennbar. Es hat somit den Anschein, als bestünde eine Beziehung zwischen der Abregulierung und der Anwesenheit tripolarer Spindeln. Der Beweis hierfür konnte noch nicht erbracht werden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Literatur

AUBIN, P. M., and M. L. R. BUCHER: A study of binucleate cell counts on resting and regenerating rat liver employing a mechanical method for the separation of liver cells. Anat.

- Rec. **112**, 797—806 (1952). — BEAMS, H. W., and R. L. KING: The origin of binucleate and large mononucleate cells in liver of the rat. *Anat. Rec.* **83**, 281—293 (1942). — BLEIER, H.: Untersuchungen über das Verhalten der verschiedenen Kernkomponenten bei der Reduktionsteilung von Bastarden. *Cellule* **40**, 85—144 (1930). — BUCHER, O.: Karyometrische Untersuchungen an zweikernigen Zellen von Bindegewebe-kulturen. *Anat. Anz.* **100**, Erg.-Bd. Verh. anat. Ges. **51**, 197—203 (1953). — GLÄSS, E.: Das Problem der Genomsonderung in den Mitosen unbehandelter Rattenlebern. *Chromosoma (Berl.)* **8**, 468—492 (1957). — GOTTSCHALK, W.: Untersuchungen zum Problem der Herabregulierung der Chromosomenzahl in experimentell erzeugten polyploiden Pflanzen. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 52—79 (1958a). — Über Abregulierungsvorgänge bei künstlich hergestellten hochpolyploiden Pflanzen. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 204—215 (1958b). — Die Bildung von Keimzellen mit euploiden Chromosomenzahlen aus triploiden und aneuploiden Pollenmutterzellen abregulierender polyploider Pflanzen. *Z. Vererb.-Lehre* **90**, 198—214 (1959). — Meiotische und prämeiotische Abregulierung. *Z. Bot.* (1960, im Druck). — HEITZ, E.: Unregelmäßigkeiten bei der Reduktionsteilung von *Melandrium album*. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **43**, 77—80 (1925a). — Beitrag zur Cytologie von *Melandrium album*. *Planta (Berl.)* **1**, 241—259 (1925b). — HOLDEN, J. W. H., and M. MOTA: Non synchronized meiosis in binucleate pollen mother cells of an *Avena hybrid*. *Heredity* **10**, 109—117 (1956). — KANÔ, L.: Degeneration of germ cells in the testes of tumor-bearing rats. *Cytologia (Tokyo)* **16**, 341—346 (1952). — KHAN, S.: Pollen sterility in *Solanum tuberosum* L. *Cytologia (Tokyo)* **16**, 124—130 (1951). — KNEIP, H.: Experimentelle Erzeugung von Rieseneiern bei *Fucus* und deren Entwicklung nach Befruchtung. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **49**, 392—402 (1931). — KREYBIG, T. v.: Untersuchungen über die Wirkung von Ganzkörper- und Teilbestrahlungen auf Jungpflanzen verschiedener Leguminosen. *Diss. Bonn* 1959. — MARQUARDT, H., und E. GLÄSS: Die Chromosomenzahlen in den Leberzellen von Ratten verschiedenen Alters. *Chromosoma (Berl.)* **8**, 617—636 (1957). — MATSUURA, H., and S. OKUNO: Cytogenetical studies on *Begonia*. *Cytologia (Tokyo)* **13**, 1—18 (1943). — MICHAELIS, P.: Über den Einfluß der Kälte auf die Reduktionsteilung von *Epilobium*. *Planta (Berl.)* **1**, 569—582 (1926). — MÜNZER, F. T.: Experimentelle Studien über die Zweikernigkeit der Leberzellen. *Arch. mikr. Anat.* **104**, 138—184 (1925). — NAMBIAR, P. K.: Effects of urethane on mitosis and meiosis in the grasshopper, *Poecilocera picta*. *Cytologia (Tokyo)* **20**, 339—357 (1955). — PERCIVAL, J.: Cytological studies of some hybrids of *Aegilops spec.* \times *wheats*, and of some hybrids between different species of *Aegilops*. *J. Genet.* **22**, 201—278 (1930). — POHLENDT, G.: Variabilität der Chromosomenzahlen und andere Kernpathologien in *Aegilops triuncialis \times *Triticum aestivum*-Bastarden. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 170—188 (1958). — PRICE, S.: Cytological studies in *Saccharum* and allied genera. I. Syncytes in certain clones of *Saccharum* and *Erianthus*. *Cytologia (Tokyo)* **21**, 21—37 (1956). — RIEGER, R.: Das Meioseverhalten von Gonotokonten mit abnormen Chromosomenzahlen bei *Antirrhinum majus* L. I. Mehrkernige Pollenmutterzellen bei haploiden Formen. *Biol. Zbl.* **77**, 237—244 (1958). — RISLER, H.: Polyploidie und somatische Reduktion in der Larvenepidermis von *Aedes aegypti* L. *Chromosoma (Berl.)* **10**, 184—209 (1959). — SAKAMURA, T.: Experimentelle Studien über Zell- und Kernteilung mit besonderer Rücksicht auf Form, Größe und Zahl der Chromosomen. *J. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo* **39**, 1—221 (1920). *Zit. nach WADA* 1939. — SASS, J. E.: Abnormal mitosis in seedlings of some *Gramineae* following seed treatment. *Amer. J. Bot.* **25**, 624—627 (1938). — SIGENAGA, M.: Experimental studies of abnormal nuclear and cell divisions. I. Observation with living cells of the effects of neutral salts and heavy metal salts. *Cytologia (Tokyo)* **13**, 380—404 (1944). — SMITH, F. H.: Anomalous spindles in *Impatiens pallida*. *Cytologia (Tokyo)* **6**, 165—176 (1935). — SNOAD, B.: Somatic instability of chromosome number in *Hymenocallis calathinum*. *Heredity* **9**, 129—134 (1955). — STOREY, W. B.: Diploid and polyploid gamete formation in orchids. *Proc. Amer. Soc. horticult. Sci.* **68**, 491—502 (1956). — SWAMINATHAN, M. S.: Einige Verfahren für die Verwendung wilder *Solanum*-Arten zu Zuchtzwecken. *Züchter* **20**, 358—360 (1950). — SWANSON, C. P., and R. NELSON: Spindle abnormalities in *Mentha*. *Bot. Gaz.* **104**, 273—280 (1942). — TISCHLER, G.: Handbuch der Pflanzenanatomie Bd. II: Allgemeine Pflanzenkaryologie. 2. Hälfte: Kernteilung und Kernverschmelzung. 2. Aufl. Berlin 1951. — VAARAMA, A.: Spindle abnormalities and variation in chromosome number in *Ribes nigrum*. *Hereditas (Lund)* **35**, 136—162 (1949). — WADA, B.: Experimentelle Untersuchungen lebender Zellen in der*

Teilung. III. Die Einwirkung der Dämpfe verschiedener Substanzen auf die Mitose bei den *Tradescantia*-Haarzellen. *Cytologia* (Tokyo) **9**, 460–479 (1939). WETTSTEIN, F. v.: Die Erscheinungen der Heteroploidie, besonders im Pflanzenreich. *Ergebn. Biol.* **2**, 311–356 (1927). — YAMAHA, G.: Experimentelle zytologische Beiträge. I. Mitt. Orientierungsversuche an den Wurzelspitzen einiger Pflanzen. *J. Fac. Sci. Imp. Univ. Tokyo, Sec. III* **2** (1927). Zit. nach SIGENAKA 1944. — YAMAHA, G., u. R. UEDA: Über den Einfluß der Ultraschallwellen auf die Wurzelspitzenzellen von *Vicia faba* L. Ein Orientierungsversuch. *Cytologia* (Tokyo) **9**, 524–532 (1939). — YAMANOUCHI, S.: Mitosis in *Fucus*. *Bot. Gaz.* **47**, 173–197 (1909). — YOSIDA, T. H.: Karyological studies of the Takizawa Quinone-carcinoma and the Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Cytologia* (Tokyo) **19**, 225–238 (1954).

Doz. Dr. WERNER GOTTSCHALK,
Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn,
Meckenheimer Allee 176

Isotope Research Division (A.E.R.E.), Wantage Radiation Laboratory, Berkshire

EFFECT OF GAMMA RADIATION ON INTERSPECIFIC INCOMPATIBILITY WITHIN THE GENUS *BRASSICA*

By

D. ROY DAVIES and E. T. WALL

(Received January 7, 1960)

Introduction

There has been considerable attention drawn in recent years to the possibility of exploiting artificially induced mutations in programmes of crop improvement. Much information has accumulated regarding the genetic effects of various mutagens on a number of crop plants but the practical results achieved when measured in terms of the artificially induced variability incorporated into new varieties, have been disappointing, and the inefficiency of the technique militates against its more general adoption at present. There are certain important exceptions to this generalisation, for example the production of loss mutations (LEWIS 1956), and the use of mutagenic agents in chromosome manipulation (ANDERSON 1956, SEARS 1956). A further specialised application, exploiting the destructive properties of radiation has been envisaged in the present experiment in which attempts were made to overcome the barriers to crossing that exist between *Brassica oleracea* ($2n = 18$), *B. campestris* ($2n = 20$) and *B. nigra* ($2n = 16$). The vast majority of the attempts that have been made to cross these three species at the diploid level have been unsuccessful, though a limited degree of success has been achieved in the following instances.

B. campestris \times *B. nigra* (U et al. 1937, RAMANUJAN and SUMVASACHAN 1943, MIZUSHIMA 1950).

B. campestris \times *B. oleracea* (U 1935; HOFFMAN and PETERS 1958).

B. nigra \times *B. oleracea* (MIZUSHIMA 1950).

Materials and methods

B. oleracea — var. Marrow Stem Kale. Clonal material was used as far as possible in all experiments.

B. campestris — var. Early Snowball.

B. nigra — seed kindly supplied by Dr. G. JOHNSON, National Vegetable Research Station.

Both male and female gametes were irradiated at all stages of development with the range of doses listed in Tables 1—6. Treatment of male gametes involved exposing plants having flowers at all stages of development from pre-meiotic pollen mother cells to mature pollen grains, and then utilising the pollen shed from successive flowers for pollinating unirradiated emasculated flowers. For the female irradiations, a similar procedure was adopted — whole plants being irradiated, the flowers later emasculated and unirradiated pollen utilised for the pollinations. The Co_{60} irradiation facility has been described previously (DAVIES and WALL 1959). Two series of crosses which proved of most interest in 1958 (Table 1) were repeated in 1959 (Table 2) utilising similar materials and techniques.

Results

Crossing programme. Numbers of flowers crossed, pods set, seeds set per pod, and hybrids produced in each series of crosses are summarised in Tables 1—6. Viable hybrids were produced from the crosses of *B. oleracea* \times *B. campestris*, *B. oleracea* \times *B. nigra* and *B. nigra* \times *B. oleracea*.

Table 1

<i>B. oleracea</i> \times <i>B. nigra</i> 1958												
Time of Pollination (Days after Irradiation)	Parent Irradiated (Total of all Doses)											
	Control				$\frac{\sigma}{\sigma}$ 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 rads.				$\frac{\sigma}{\sigma}$ 100, 500, 1000 rads.			
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
0	81	21	2.2	—	24	8	0.8	—	44	9	0.9	—
2					118	33	1.9	1	79	17	2.9	—
4					76	19	1.0	1	42	—	—	—
6					79	37	6.9	7	45	24	2.9	—
8					90	59	6.6	4	128	66	3.6	—
10					182	137	2.2	3	110	75	2.8	2
12					236	220	2.0	4	104	69	3.3	1
14					239	195	5.1	4	55	44	3.2	—
16					149	106	4.9	1	30	6	0.3	—
18					35	18	7.1	—	19	8	8.5	1
20					35	33	6.2	1	44	38	5.6	—
22					45	35	10.0	—	25	19	7.5	—
24					26	5	3.2	—	8	2	0.5	—
26					18	11	6.2	—	8	5	2.6	—

a No. of flowers pollinated. b No. of pods set. c Seeds per pod. d No of viable hybrids.

Table 2

<i>B. oleracea</i> \times <i>B. nigra</i> 1959												
Time of Pollination (Days after Irradiation)	Parent Irradiated (Total of all Doses)											
	Control				$\frac{\sigma}{\sigma}$ 500, 1000 rads.				$\frac{\sigma}{\sigma}$ 500 rads.			
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
0	348	144	0.6	—	122	22	3.9	2	172	44	0.1	—
2					96	26	1.8	—	135	68	0.9	—
4					163	33	1.9	—	101	32	1.0	—
6					158	50	1.1	—	197	60	2.5	—
8					87	68	2.3	—	150	63	4.5	1
10					222	107	3.7	—	171	67	1.2	—
12					48	29	0.5	—	95	60	0.5	—
14					284	152	3.9	2	78	77	3.0	—
16					145	58	4.3	—	90	66	1.2	—
18					47	19	2.0	—	29	28	1.3	—
20					23	19	0.7	—	10	8	—	—
22					26	15	0.0	—				

a No. of flowers pollinated. b No. of pods set. c Seeds per pod. d No. of viable hybrids.

Discussion

Of the nine series of crossing programmes undertaken, four resulted in the production of viable hybrids. In one series—that of *B. nigra* (irrad) \times *B. ole-*

racea—the frequency with which hybrids were produced after irradiation did not differ from that in the control series, and will not be considered further. In the case of the *B. oleracea* (irrad) \times *B. campestris* programme, one triploid hybrid

Table 3

<i>B. nigra</i> \times <i>B. campestris</i>												
Time of Pollination (Days after Irradiation)	Parent Irradiated (Total of all Doses)											
	Control				100, 500, 1000 rads. ♀				100, 500, 1000 rads. ♂			
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
0	36	36	3.1	—	30	11	3.4	—	34	20	1.9	—
2					71	36	2.2	—	41	27	3.2	—
4					100	48	1.8	—	61	31	3.9	—
6					59	31	2.6	—	86	54	2.7	—
8					61	26	1.9	—	76	48	3.4	—
10					67	26	2.4	—	58	33	3.7	—
12					31	7	1.4	—	35	23	1.9	—
14					50	33	0.8	—	40	18	2.0	—
16					37	17	0.6	—	57	33	2.1	—
18					48	24	0.5	—	48	31	2.3	—
20					30	19	3.9	—	54	35	2.8	—
22					4	2	2.0	—	54	37	1.3	—
24									33	17	0.9	—

a No. of flowers pollinated. b No. of pods set. c Seeds per pod. d No. of viable hybrids.

Table 4

<i>B. oleracea</i> \times <i>B. campestris</i>												
Time of Pollination (Days after Irradiation)	Parent Irradiated (Total of all Doses)											
	Control				50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 rads. ♀				100, 500, 1000 rads. ♂			
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
0	93	38	4.1	—	313	137	7.7	—	40	9	7.1	—
2					156	57	4.2	—	43	9	5.8	—
4					112	69	5.1	—	42	7	8.6	—
6					67	64	7.3	—	43	24	8.7	—
8					81	71	9.1	1	97	68	6.2	—
10					52	35	6.4	—	113	82	4.8	—
12					23	17	3.1	—	112	89	3.0	—
14					36	19	3.1	—	49	41	4.9	—
16					50	30	2.8	—	33	13	9.2	—
18					33	24	3.3	—	27	22	9.0	—
20					44	34	3.5	—	32	21	9.5	—
22					23	12	0.6	—	30	21	7.0	—
24					22	11	2.8	—	—	—	—	—
26					16	5	1.0	—	12	11	4.6	—

a No. of flowers pollinated. b No. of pods set. c Seeds per pod. d No. of viable hybrids.

was produced. Diploid gametes are frequently formed after exposure of dividing gametic tissues to irradiation, due to spindle upsets. U (1935) has reported the production of a similar hybrid.

Of most interest was the crossing programme involving *B. oleracea* \times *B. nigra*. This has previously proved unsuccessful, and was unsuccessful in the control

series in this experiment. There is no barrier to pollen tube growth, but embryos abort at an early stage. After irradiating the female parent, a total of thirty hybrids were produced from 2767 flowers pollinated (Tables 1 and 2). All thirty

Table 5

<i>B. nigra</i> × <i>B. oleracea</i>								
Time of Pollination (Days after Irradiation)	Control				♀ Irradiated Total of 100, 500 and 1000 rads.			
	a	b	c	d	a	b	c	d
0	40	40	2.1	2	51	28	1.3	2
2					47	25	3.9	4
4					73	55	1.7	11
6					67	27	5.5	1
8					38	11	5.1	—
10					22	6	3.0	—
12					—	—	—	—
14					39	19	2.4	—
16					15	2	1.0	—
18					29	15	2.4	—
20					4	1	2.0	—

a No. of flowers pollinated. b No. of pods set. c Seeds per pod. d No. of viable hybrids.

Table 6

<i>B. campestris</i> × <i>B. nigra</i>												
Time of Pollination (Days after Irradiation)	Parent Irradiated (Total of all Doses)											
	Control				100, 500, 1000 rads. ♀				100, 500, 1000 rads ♂			
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d
0	36	35	0.7	—	16	—	—	—	23	7	0.6	—
2					14	—	—	—	8	—	—	—
4					4	4	1.0	—	37	14	0.6	—
6					50	11	0.8	—	24	—	—	—
8					6	—	—	—	34	15	2.7	—
10					76	30	1.8	—	60	28	2.2	—
12					54	11	0.5	—	29	6	1.1	—
14					28	12	0.7	—	70	10	1.4	—
16					35	1	—	—	7	—	—	—
18					33	3	0.3	—	30	2	2.5	—
20					23	1	—	—	46	2	0.5	—
22					14	—	—	—	48	7	—	—
24					12	—	—	—	25	—	—	—

a No. of flowers pollinated. b No. of pods set. c Seeds per pod. d No. of viable hybrids.

hybrids were triploid having two genomes of *B. oleracea* (genome C) and one of *B. nigra* (genome B). When the male parent *B. nigra* was irradiated, many fewer hybrids were produced of which four were diploids (CB) and one triploid. The triploid was again of genomic constitution, CC B, probably the result of a spontaneously occurring diploid female gamete. The data are summarised in Table 8.

No adequate explanation is available of the differences between the results of the crosses undertaken in 1958 and 1959 (Tables 1 and 2). The genotypes utilised were the same and irradiation conditions were similar. However pre and

post irradiation environmental conditions were not controlled and possibly quite different in the two years. The two doses chosen for the 1959 series of crosses—500 rads and 1000 rads—were the optimum ones for producing viable hybrids in 1958 and hence a higher frequency of the latter might have been expected in 1959.

There is no fundamental incompatibility between the B and C genomes, as viable hybrids have been produced from the *B. nigra* × *B. oleracea* cross in the present experiment and by MIZUSHIMA (1950). An explanation of the present results—the production of hybrids only after irradiation, of solely triploid progeny after female parent irradiation and diploid progeny after male parent irradiation—is probably to be found in the relationship of embryo, endosperm and maternal tissue.

Table 7. *Analyses of hybrids*

Cross	Plants produced	Plant number	2n	Pairing behaviour ¹	Pollen fertility %	Viable seed production
1958 <i>B. oleracea</i> (irrad) × <i>B. campestris</i> .	1	1	28	0—3 _{III} + 9—6 _{II} + 10—7 _I	25.6	None on selfing, backcrossing or open pollination
<i>B. oleracea</i> (irrad) × <i>B. nigra</i> . . .	26	1—26	26	8—9 _{II} + 10—8 _I	8.7 to 24.0	Viable seed from one plant on selfing. Up to 4 viable seeds from plants on backcrossing to <i>B. oleracea</i> . Variable numbers from 0—30 viable seeds per plant on open pollination
<i>B. oleracea</i> × <i>B. nigra</i> (irrad)	4	1	17	2—4 _{II} + 13—9 _I	20.2	2 viable seed on open pollination
		2	17	2—4 _{II} + 13—9 _I	4.2	3 viable seed on open pollination
		3	26	8—9 _{II} + 10—8 _I	10.4	30 viable seed on open pollination.
		4	17		8.4	10 viable seed on open pollination
<i>B. nigra</i> (irrad) × <i>B. oleracea</i> . .	18	1—18	17	2—4 _{II} + 13—9 _I	2.5 to 21.4	0—30 viable seeds per plant on open pollination.
1959 <i>B. oleracea</i> (irrad) × <i>B. nigra</i> . . .	4	1—4	26			
<i>B. oleracea</i> × <i>B. nigra</i> (irrad)	1	1	17			

¹ III Trivalents. II Bivalents. I Univalents.

It is possible however that an interaction of the cytoplasm of the two species has led to the incompatibility—irradiation of either male or female cytoplasm destroying it. Triploidy after female irradiation would then be merely an associated secondary effect of irradiation but the fact that every progeny of female irradiation was triploid renders this explanation unlikely. A more likely explanation of the results is that differences in gene dosages or balance after irradiation may lead to a more normal development of the ovular tissues, and we can consider a hypothesis based on the dominance of a factor or factors from

Table 8

	Flowers pol- linated	Diploid hybrids (C'B)	Triploid hybrids (CC'B)
Control (no irradiation) .	429	—	—
Female parent irradiated .	2767	—	30
Male parent irradiated . .	1957	4	1

B. nigra. If we assume that the genome B has a factor β effectively dominant in the hybrid over a factor γ from the C genome, and the endosperm due to the presence of two doses of γ is effectively γ in reaction, this could provide

a basis for an incompatibility between endosperm and embryo. Triploid embryos are effectively γ , and in the irradiated B gametes which gave the diploid hybrids the β factor has been mutated or lost. The rate of occurrence of diploid hybrids after irradiating the B genome is compatible with mutation rates. 1957 flowers were crossed and each *B. oleracea* stigma holds approximately 6000 pollen grains indicating a mutation rate of 1 per 3×10^6 pollen grains tested. The nature of such an incompatibility reaction having this drastic effect is difficult to visualise, though an analogy with an antigen-antibody reaction is implied. In this connection it is of interest to note that in *Datura* hybrids, RAPPAPORT et al. (1950) have demonstrated the presence of a substance in the proliferating endothelium of the incompatible crosses which inhibits the growth in vitro of selfed embryos of the parental species.

STEBBINS (1958) in his review of hybrid inviability has listed many examples of interspecific incompatibility arising from an upset in the relationship of embryo and surrounding tissues and has stressed the importance of unbalance of gene dosage in the different tissues of the ovule after interspecific crossing. Evidence supporting STEBBINS' hypothesis was obtained by NISHYAMA and IIZUKA (1952) who obtained two hybrids from the normally incompatible crosses of *Avena strigosa* (2 κ) \times *A. barbata* (4 κ) and *A. strigosa* \times *A. sativa* (6 κ) after irradiating pollen with X-rays. STEBBINS (l.c.) concluded that the viable hybrids had suffered loss mutations of certain genes which contributed most strongly to the dosage unbalance in hybrids made with non-irradiated pollen. REUSCH (1956) has shown that some genotypes of *Lolium perenne* and *Festuca pratensis* can be also modified by radiation in such a way that a higher percentage of *Lolium-Fescue* hybrids seeds germinate.

We have investigated two other series of crosses on the same scale as the present one, and utilising similar techniques. One involved *Vicia faba* and *V. narbonensis* and the other *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. The former series of crosses were wholly unsuccessful in terms of viable hybrid production, though a significant increase was obtained after irradiation in the number of large embryos produced. From the *Lycopersicon* crossing programme, where the

interspecific incompatibility is related to the self-incompatibility of *L. peruvianum*, two hybrids were produced utilising *L. esculentum* as the female parent, but other investigators have reported the very rare production of hybrids from this cross. It is of interest to note that the one hybrid produced after female irradiation was triploid, and the one after male irradiation diploid — a similar situation to that in the *Brassica* crosses considered.

In those species where there is genetic variability controlling interspecific compatibility, it remains to be seen whether such variability is to be found more easily by irradiating gametes or by screening naturally occurring genotypes of each parent species. In instances where unbalance of gene dosage in endosperm tissues is important, the relative merits of embryo culture and irradiation would have to be considered also. The diversity of interspecific barriers to crossing in plants makes it impossible to extrapolate from the present results and forecast whether this essentially destructive property of ionising radiation, can be exploited in other examples of interspecific incompatibility.

Summary

1. An attempt has been made to exploit the destructive properties of ionising radiations in overcoming the barriers to hybridisation that exist between *Brassica oleracea*, *B. campestris* and *B. nigra*.

2. One series of crosses involving *B. oleracea* \times *B. nigra* was successful only after irradiating the gametes or stylar tissues prior to crossing. After exposing female gametes, triploid, and after exposing male gametes, diploid progeny were produced.

3. An explanation of these results is sought in terms of a change in the relationship of embryo and maternal or endosperm tissues.

Acknowledgements. We are grateful to Professor K. MATHER for his comments, and criticism of the manuscript, and to Miss C. MARSHALL and Mr. D. SOUTHERN for assistance with the crossing programmes.

References

- DAVIES, D. R., and E. T. WALL: Induced mutations at the V_{by} locus of *Trifolium repens*. I. Heredity (in press). 1959. — HOFFMAN, W., and R. PETERS: Versuche zur Herstellung synthetischer und semisynthetischer Rapsformen. Züchter **28**, 40—51 (1958). — LEWIS, D.: Incompatibility and plant breeding. Brookhaven Symposia. Biology **9**, 89—96 (1956). — MIZUSHIMA, U.: Karyogenetic studies of species and genus hybrids in the tribe *Brassicaceae* of the *Cruciferae*. Tohoku J. Agric. Res. **1**, 15—27 (1950). — NISHIYAMA, I., and M. IZUKA: Successful hybridization by means of X-rayed pollen, in otherwise incompatible crosses. Bull. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ. **8**, 81—89 (1952). — RAMANUJAM, S., and D. SUM-
VASACHAN: Cytogenetic studies in genus *Brassica*. The artificial synthesis of *B. juncea*. Indian J. Genetics and Plant Breeding **3**, 73—88 (1943). — RAPPAPORT, J., S. SATINA and A. F. BLAKESLEE: Extracts of ovular tumours and their inhibition of embryo growth in *Datura*. Amer. J. Bot. **37**, 586—594 (1950). — REUSCH, J. D. H.: Influence of gamma irradiation on the breeding affinities of *Lolium perenne* and *Festuca pratensis*. Nature (Lond.) **178**, 929—930 (1956). — STEBBINS, G. L.: The inviability, weakness and sterility of interspecific hybrids. Advanc. Genet. **9**, 147—215 (1958). — U, N.: Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilisation. Jap. J. Bot. **7**, 389—452 (1935). — U, N., U. MIDUSIMA and K. SAITO: Diploid and triploid *Brassica-Raphanus* hybrids. Cytologia (Tokyo) **8**, 319—326 (1937).

Dr. D. ROY DAVIES, Isotope Research Division (A.E.R.E.) Wantage Radiation Laboratory, Berkshire (Great Britain)

Abteilung Strahlenbiologie, Institut für Genetik der Universität Köln

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN AN HNO_2 -INAKTIVIERTEN UND UV-INAKTIVIERTEN BAKTERIOPHAGEN T4

Von

WALTER HARM

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 21. März 1960)

A. Einleitung

Salpetrige Säure (HNO_2) bewirkt durch Desaminierung der Basen bei der infektiösen Ribonukleinsäure des Tabakmosaik-Virus Inaktivierung (SCHUSTER und SCHRAMM 1958) und Mutation (MUNDRY und GIERER 1958). Die inaktivierende und mutagene Wirkung zeigt sich auch bei Bakterienzellen (KADEWITZ 1959) und bei Bakteriophagen (VIELMETTER und WIEDER 1959; TESSMAN 1959). Da man annehmen darf, daß die HNO_2 -Wirkung sich auch bei den Phagen vorwiegend an der Nukleinsäure abspielt, erschien ein Vergleich zwischen der HNO_2 -Inaktivierung und der ebenfalls für die Nukleinsäure spezifischen, aber in ihrem Wirkungsmechanismus unterschiedlichen UV-Inaktivierung sinnvoll. Trotz der äußerlichen Ähnlichkeit der Überlebensfunktion nach beiderlei Einwirkungen zeigten die inaktivierten Phagen hinsichtlich verschiedener Kriterien (z. B. Multiplizitätsreaktivierung, Kreuzungsreaktivierung, Host-killing Efficiency u.a.m.) erhebliche quantitative Unterschiede, die im folgenden mitgeteilt und diskutiert werden sollen.

B. Material und Methodik

Für die Untersuchungen wurden die Phagen T4 Wildtyp (DOERMANN), T4 r47 (DOERMANN), T4 r227 (BENZER) und T4 r102 (BENZER) und T2 r (LURIA) verwendet, als Wirtsbakterien *Escherichia coli* B und *Escherichia coli* K 12 (λ). Die HNO_2 -Inaktivierung erfolgte bei $(37 \pm 0,2)^\circ \text{C}$ durch Zugabe von NaNO_2 (Konzentration 0,2 molar) zu Phagensuspensionen in Standard-Acetatlösung pH 4,62 (Merck); die Beendigung der Inaktivierung geschah durch Verdünnen 1:50 in eisgekühlten Phosphat-Puffer. Zur UV-Inaktivierung diente eine Hg-Niederdrucklampe (Osram HNS 12), die als effektive Wellenlänge fast ausschließlich die Linie 2537 Å emittiert; Photo-Reaktivierung wurde durch Arbeiten bei Gelblicht vermieden. Als Dosismaß diente für die HNO_2 -Inaktivierung wie auch für die UV-Inaktivierung die Zeitdauer der Einwirkung (unter konstant gehaltenen Bedingungen). In den graphischen Darstellungen, in denen HNO_2 -Effekte und UV-Effekte miteinander verglichen werden, ist das Verhältnis der Zeitskalen so gewählt, daß die Überlebenskurven bei Inaktivierung freier Phagen identisch verlaufen; dabei sind 10 min HNO_2 -Behandlung wirkungsgleich mit 44 sec UV-Bestrahlung. Die allgemeine Versuchsmethodik entsprach den Angaben bei ADAMS (1959).

C. Ergebnisse

1. *Inaktivierung.* Die Inaktivierung freier Phagen T2 r und T4 durch HNO_2 ist im wesentlichen eine Exponentialfunktion der Einwirkungszeit t , d. h. der Überlebenden-Bruchteil nimmt nach der Funktion $N/N_0 = e^{-kt}$ ab, wobei k die Inaktivierungswahrscheinlichkeit pro Individuum, bezogen auf die Zeiteinheit, bedeutet (Abb. 1). Allerdings zeigt sich bei Darstellung der T4-Kurven im

halblogarithmischen Raster häufig im Bereich der kurzen Einwirkungszeiten eine schwache Krümmung, wie sie bekanntlich auch bei der UV-Inaktivierung dieses Phagen gefunden wird.

Entsprechend dem etwa gleichen Gehalt der Phagen T2 und T4 an Desoxy-Ribonukleinsäure (DNS) sind unter identischen Versuchsbedingungen die Werte von k für frisch hergestellte Lysate beider Phagentypen etwa übereinstimmend.

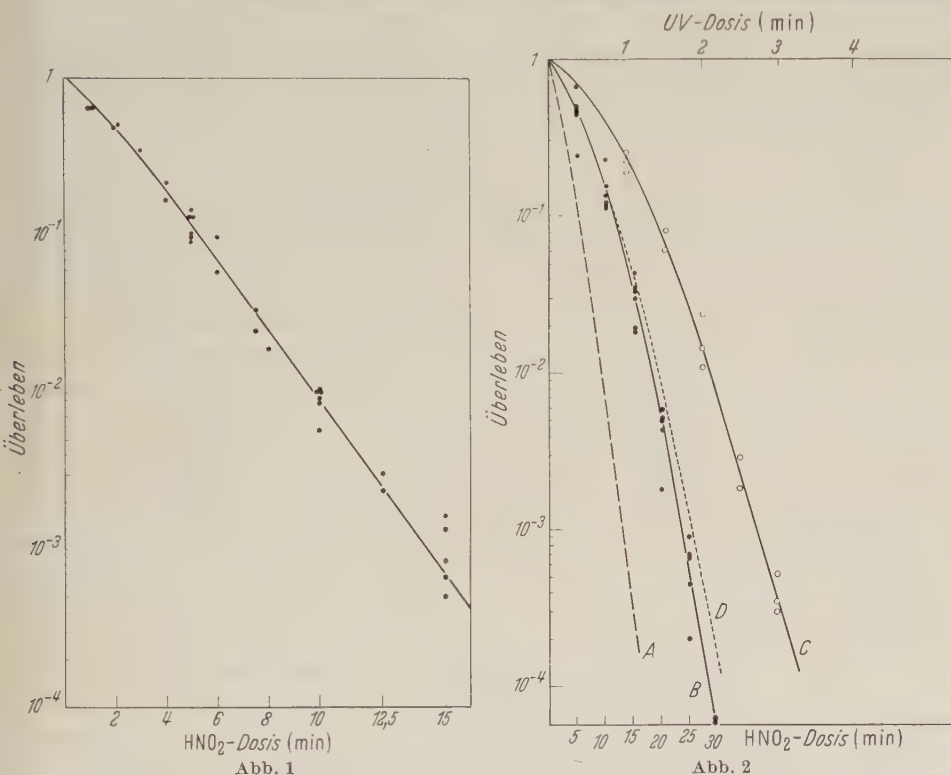


Abb. 1. Überleben des Phagen T4 Wildtyp als Funktion der HNO_2 -Dosis (7 Experimente)

Abb. 2. Überleben des Phagen T4 als Funktion der HNO_2 -Dosis und der UV-Dosis: Kurve A (gestrichelt): bei Einzelinfektion (HNO_2 oder UV). Kurve B (●): bei HNO_2 -Einwirkung und Mehrfachinfektion ($m = 1-2$). Kurve C (○): bei UV-Einwirkung und Mehrfachinfektion ($m = 1-2$). Kurve D (gepunktet): erwartete Kurve für HNO_2 -Einwirkung (s. Diskussion)

Jedoch zeigte sich ein T2r-Lysat, das bereits über 2 Jahre alt war, stets eine wesentlich stärkere Empfindlichkeit, d. h., die k -Werte betrugen das 1,6—1,8fache gegenüber frischen Lysaten, die daraus hergestellt wurden. Dieses Lysat erwies sich auch als geringfügig UV-empfindlicher.

2. Multiplizitätsreaktivierung. Infiziert man Bakterienzellen gleichzeitig mit mehreren UV-inaktivierten Phagen, so findet zwischen ihnen Multiplizitätsreaktivierung statt (LURIA und DULBECCO 1949). Sie besteht darin, daß die in einer Zelle befindlichen nichtinaktivierten Anteile der DNS mehrerer *inaktivierter* Phagen rekombiniert werden und damit gemeinsam die Produktion einer lebensfähigen Nachkommenschaft ermöglichen. Die in Abb. 2 dargestellten Versuchsergebnisse zeigen, daß die Multiplizitätsreaktivierung auch bei HNO_2 -inaktivierten Phagen auftritt. Die gestrichelte Kurve (A) repräsentiert das Überleben der

T4-Phagen nach HNO_2 - oder UV-Einwirkung bei Einzelinfektion (d. h. bei einer durchschnittlichen Infektionsmultiplizität¹ von $m < 10^{-3}$; die durchgezogenen Kurven B (für HNO_2) und C (für UV) geben das Überleben der Phagen bei Infektion mit höherer Multiplizität ($m = 1$ bis 2) wieder, wobei nur Bakterienzellen mit 2 oder mehr Phagen („Multikomplexe“) berücksichtigt wurden. Zur Ermittlung

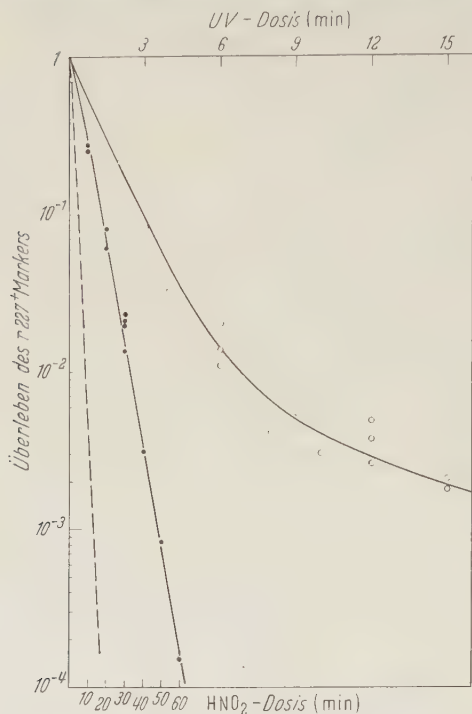


Abb. 3. Überleben des $r227^+$ -Markers von T4 als Funktion der HNO_2 -Dosis (●) und der UV-Dosis (○) in Kreuzungs-Reaktivierungs-Experimenten. Zum Vergleich ist die Überlebenskurve des Gesamtphagen eingetragen (gestrichelt)

kommenschaft des Komplexes wiedererscheinen (DOERMANN et al. 1955). Dieses Phänomen wird als Kreuzungsreaktivierung (oder „marker rescue“) bezeichnet; es beruht unserer heutigen Kenntnis nach darauf, daß das markertragende Genomstück innerhalb der begrenzenden UV-Treffer rechts und links des Markers durch zweimalige Rekombination in das Genom eines nichtaktivierten Phagen inkorporiert wird. Als Kriterium für die Kreuzungsreaktivierung dient das Auftreten des betreffenden Markers in mindestens 1 Individuum der lebensfähigen Nachkommenschaft des Komplexes.

Die Kreuzungsreaktivierung wurde für den $r227^+$ -Marker bei HNO_2 -inaktivierten (und vergleichsweise bei UV-inaktivierten) T4-wildtyp-Phagen untersucht; die nichtinaktivierten Phagen waren vom Typ T4 $r227^-$. Als Wirtszellen wurden *E. coli* B benutzt und zur Selektion derjenigen Komplexe, die lebens-

dieser Überlebenswerte mußte der Anteil der Monokomplexe (d. h. der Bruchteil $\frac{m \cdot e^{-m}}{1 - e^{-m}}$ der Gesamtkomplexe) für die unbehandelte Probe und (unter Berücksichtigung ihrer Inaktivierungsfunktion) auch für die HNO_2 - oder UV-behandelten Proben, jeweils rechnerisch eliminiert werden. Die Bedeutung der gepunkteten Kurve (D) wird noch in der Diskussion besprochen.

Die Differenz zwischen der gestrichelten Kurve und den Multi-komplex Überlebenskurven für HNO_2 - und UV-Einwirkung ist ein Maß für die Multiplizitätsreaktivierung; wie ersichtlich, ist diese bei HNO_2 -inaktivierten Phagen erheblich schwächer ausgeprägt als bei UV-inaktivierten.

3. Kreuzungsreaktivierung. Werden Bakterienzellen mit einem UV-inaktivierten Phagen und gleichzeitig mit einem oder mehreren nichtinaktivierten Phagen infiziert, so können genetische Merkmale des ersteren in der lebensfähigen Nach-

¹ Als durchschnittliche Infektionsmultiplizität m wird das Verhältnis (adsorbierte Phagen): (Bakterienzellen im Adsorptionsgemisch) bezeichnet.

fähige $r227^+$ -Phagen produzierten, wurde auf Indikatorbakterien *E. coli* K 12 (λ) ausgeplattet, auf denen $r227$ im Gegensatz zu $r227^+$ keine Plaques zu bilden vermag (BENZER 1955). Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 3 graphisch dargestellt. Durch geeignete Wahl der Abszissenmaßstäbe wurden wiederum die Überlebenskurven der freien T4-Phagen (gestrichelt gezeichnet) für HNO_2 - und UV-Inaktivierung zur Deckung gebracht. Obwohl der Kreuzungsreaktivierungseffekt nach HNO_2 -Inaktivierung recht erheblich ist, bleibt er in seinem Ausmaß doch hinter dem Effekt nach UV-Inaktivierung weit zurück. Das für die UV-Kreuzungsreaktivierung charakteristische Flacherwerden der Kurve mit steigender Dosis konnte in dem für die HNO_2 -Inaktivierung prüfbaren Bereich nicht beobachtet werden. Grundsätzlich die gleichen Ergebnisse wurden mit dem Marker $r102^+$ von T4 erhalten.

4. Kreuzungsreaktivierung bei kombinierter UV- und HNO_2 -Einwirkung. Als Ursachen für das geringe Ausmaß der Multiplizitäts- und Kreuzungsreaktivierung nach HNO_2 -Inaktivierung, verglichen mit UV-Inaktivierung, kommen in erster Linie infrage:

a) Die Rekombinationsfähigkeit der nichtgeschädigten Bereiche ist bei HNO_2 -Inaktivierung gegenüber UV-Inaktivierung herabgesetzt.

b) Gewisse HNO_2 -Letalschäden sind grundsätzlich nicht multiplizitäts- und kreuzungsreaktivierbar, weil sie frühe Funktionen bei der Infektion betreffen

(z. B. Adsorption, Injektion oder intrazelluläre Funktionen, die der Rekombination vorausgehen müssen), so daß die davon betroffenen Individuen gar nicht das Stadium erreichen, in dem sie multiplizitäts- oder kreuzungsreaktivierbar wären.

Zwei weitere Experimente, in denen die

Kreuzungsreaktivierung des $r227^+$ -Markers nach einer kombinierten UV-

und HNO_2 -Einwirkung untersucht wurde, sprechen sehr für die Möglichkeit b; die Ergebnisse sind in der Tabelle wiedergegeben. Die Marker-Überlebenswerte liegen bei der kombinierten Behandlung um das 6—8fache tiefer, als bei einer reinen UV-Bestrahlung gleicher Trefferzahl zu erwarten wäre. Da bei den verwendeten Dosen der Anteil der UV-Treffer etwa 85 bzw. 88% der Gesamtzahl der Treffer betrug, sollte bei kombinierter Behandlung und zufallsgemäßer Verteilung der Treffer das markertragende Stück noch in 72 bzw. 77% der Fälle rechts und links von einem UV-Treffer begrenzt sein. Das bedeutet, daß bei Zutreffen der Deutungsmöglichkeit a die experimentellen Werte allerhöchstens um den Faktor 1,4 tiefer liegen dürften als die theoretisch erwarteten, wenn man nicht die unplausible Zusatzannahme machen will, daß die außerhalb der das markertragende Stück begrenzenden UV-Treffer gelegenen

Tabelle

Behandlung	Überleben des $r227^+$ Markers	
	Versuch 1	Versuch 2
(I) 12 min UV	0,49%	0,38%
(II) 12 min UV + 30 min HNO_2	0,033%	0,027%
(III) Theoretische Erwartung für 12 min UV + 30 min HNO_2 auf Grund der Trefferzahl .	0,26%	0,22%
Verhältnis (III):(II) . . .	7,9	8,1
(IV) 15 min UV	0,21%	0,18%
(V) 15 min UV + 30 min HNO_2	0,018%	0,014%
(VI) Theoretische Erwartung .	0,11%	0,10%
Verhältnis (VI):(V). . . .	6,1	7,1

HNO_2 -Treffer die Rekombinationsfähigkeit des innerhalb der begrenzenden UV-Treffer gelegenen ungeschädigten markertragenden Stücks beeinträchtigen. Für das Zutreffen der Deutungsmöglichkeit b spricht, daß die Faktoren, um die die experimentellen Werte gegenüber den theoretisch erwarteten zu tief liegen, etwa von der gleichen Größe sind wie der Faktor zwischen dem Marker-Überleben bei 30 min HNO_2 -Inaktivierung und dem Marker-Überleben bei einer treffermäßig gleich starken UV-Inaktivierung (vgl. Abb. 3).

5. *Inaktivierung der rII -A- und rII -B-Funktion.* KRIEG (1959) entwickelte eine Methode, die es ermöglicht, das funktionelle Überleben zweier Gene („Cistren“ nach der Nomenklatur von BENZER 1957) unabhängig vom Überleben des Phagen selbst zu bestimmen. Es handelt sich um die beiden Cistren rII -A und rII -B, die auf ihre genetische Feinstruktur hin sehr genau untersucht sind (BENZER 1957) und die im Wildtyp-Zustand dem Phagen gestatten, auch auf einem wachsenden Rasen von *E. coli* K 12 (λ) Plaques zu bilden, während die in dem einen oder anderen der beiden Cistren mutierten Phagen ($-rII$ -Mutanten) nicht dazu in der Lage sind.

Um die Funktionsfähigkeit des rII -A- oder rII -B-Cistrons im Wildtyp-Phagen nach einer inaktivierenden Einwirkung bestimmen zu können, muß dieser Phage zusammen mit einem oder mehreren nichtinaktivierten Individuen einer rII -A- bzw. rII -B-Mutante die gleiche K 12 (λ)-Zelle infizieren. Ist die Funktion des betreffenden rII -Cistrons des Wildtyp-Phagen selbst noch nicht inaktiviert, so bewirkt sie, daß sich die zugleich infizierende rII -Mutante in der K 12 (λ)-Zelle vermehren kann und bei nachfolgendem Ausplatten des Komplexes auf *E. coli* B ein Plaque bildet. Dies ist dagegen im allgemeinen nicht möglich, wenn die Funktion des betreffenden rII -Wildtyp-Cistrons durch UV inaktiviert ist. Allerdings ist ein geringer Prozentsatz der aus K 12 (λ)-Zellen und rII -Mutanten bestehenden Komplexe auch ohne Anwesenheit des entsprechenden funktionsfähigen rII -wildtyp-Cistrons zur Plaquebildung auf *E. coli* B fähig („Transmissionskomplexe“), was den Anwendbarkeitsbereich der Methode etwas einschränkt und vielfach Korrekturen notwendig macht.

Nach KRIEG (1959) ist das funktionelle Überleben des rII -A- bzw. des rII -B-Cistrons eine Exponentialfunktion der UV-Dosis mit einer Empfindlichkeit von 10 bzw. 5% der Gesamtempfindlichkeit des T4-Phagen. Dieses Verhältnis der formalen Treffbereiche von 2:1 entspricht auch dem durch Kreuzungsexperimente ermittelten Größenverhältnis der beiden Cistren (BENZER 1955).

Analog zu den Experimenten von KRIEG wurde das funktionelle Überleben der beiden Cistren bei Einwirkung von HNO_2 untersucht. Als Stämme dienten hierzu T4 $r47$ (Mutation im A-Cistron) und T4 $r227$ (Mutation im B-Cistron) sowie T4 Wildtyp, der die beiden Cistren in unmutiertem Zustand besitzt.

Das funktionelle Überleben der beiden Cistren relativ zu dem Überleben des Gesamtphagen, ist in Abhängigkeit von der angewendeten HNO_2 -Dosis in Abb. 4 dargestellt. Dabei zeigte sich, daß die Empfindlichkeit beider Cistren nur wenig unterschiedlich ist und etwa 18 bzw. 23% der Gesamtempfindlichkeit des Phagen (gestrichelt gezeichnet) beträgt. Zum Vergleich sind die Geraden für 10% und 5% der Gesamtempfindlichkeit des Phagen (entsprechend KRIEGS Ergebnissen mit UV) eingetragen. Geht man von der Voraussetzung aus, daß in Wirklichkeit die relative Empfindlichkeit des A-Cistrons zu der des B-Cistrons sich wie 2:1

verhalten müßte, so wäre der in der Abbildung wiedergegebene Befund ebenfalls mit der Annahme zu deuten, daß jeweils nur ein bestimmter Prozentsatz der HNO_2 -inaktivierten Phagen in ein Stadium kommt, in dem die Funktionsfähigkeit des Cistrons, auch wenn sie selbst nicht zerstört ist, realisiert werden kann. Berechnet man diesen Prozentsatz als Funktion der angewandten HNO_2 -Dosis, so findet man ihn in guter Übereinstimmung mit dem Prozentsatz der HNO_2 -inaktivierten Phagen, die das multiplizitäts- und kreuzungsreaktivarierbare Stadium erreichen, wie in der Diskussion noch näher ausgeführt wird.

6. *Host-Killing-Efficiency.* UV-inaktivierte Phagen sind in vielen Fällen noch fähig, Wirtsbakterienzellen zu töten (LURIA und DELBRÜCK 1942). Die folgenden Ergebnisse zeigen, daß dies auch für HNO_2 -inaktivierte Phagen zutrifft, wobei jedoch die „host-killing efficiency“ weit geringer ist als bei UV-inaktivierten Phagen.

Werden unbehandelte Phagen an Bakterienzellen adsorbiert, so überleben nur die nichtinfizierten Zellen; ihr prozentualer Anteil an der gesamten Zellpopulation beträgt bei einer zufallsgemäßen Verteilung der Adsorptionsergebnisse e^{-m} , wenn mit m wiederum die durchschnittliche Infektionsmultiplizität bezeichnet wird. Werden die Phagen unter sonst gleichen Adsorptionsbedingungen zuvor HNO_2 -behandelt oder UV-bestrahlt, so läßt sich die durchschnittliche Multiplizität m^* der noch zum „host-killing“ fähigen Individuen jeweils errechnen, indem der experimentell erhaltene (mit zunehmender Dosis ansteigende) Bruchteil der überlebenden Bakterienzellen gleich e^{-m^*} gesetzt wird. Demzufolge ist der Wert m^*/m ein Maß für denjenigen Prozentsatz der Phagenpopulation, bei dem nach der jeweiligen Behandlung die Wirtstötungsfähigkeit noch erhalten geblieben ist. Die Abnahme dieses Prozentsatzes bei T4-Wildtyp-Phagen als Funktion der

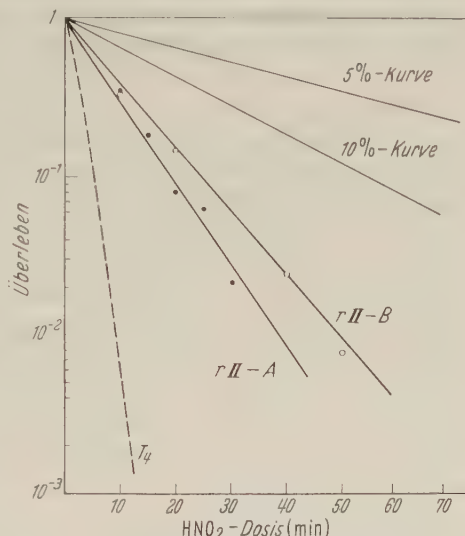


Abb. 4. Überleben der Funktionsfähigkeit des rII -A- und rII -B-Cistrons von T4 als Funktion der HNO_2 -Dosis. Die gestrichelte Kurve repräsentiert das Überleben des Gesamtphegen als reproduktionsfähige Einheit. Zum Vergleich sind die Kurven für 10 und 5 % der Gesamttemplefindlichkeit des Phagen eingetragen, wie sie dem funktionellen Überleben des rII -A- bzw. rII -B-Cistrons bei UV-Bestrahlung entsprechen (KRIEG 1959)

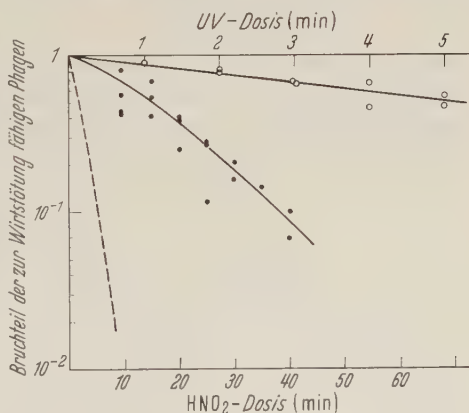


Abb. 5. Bruchteil der T4-Phagen, die zur Tötung der Wirtsbakterienzellen fähig sind, als Funktion der HNO_2 -Dosis (●) und der UV-Dosis (○). Die gestrichelte Kurve gibt zum Vergleich das Gesamtüberleben der T4-Phagen wieder

Einwirkungszeit von HNO_2 oder UV ist in Abb. 5 wiedergegeben. Sie ist für HNO_2 -Einwirkung wesentlich stärker als für UV-Bestrahlung. Die gestrichelt eingetragene Kurve zeigt zum Vergleich die Abnahme der Reproduktionsfähigkeit der Phagen nach HNO_2 - oder UV-Einwirkung.

D. Diskussion

Die Tatsache, daß Multiplizitäts-(MR) und Kreuzungs-Reaktivierung (KR) auch bei HNO_2 -inaktivierten Phagen stattfindet, ist eine weitere Stütze für die bereits sehr gut fundierte Hypothese, daß beiden Erscheinungen genetische Rekombinationsvorgänge zugrunde liegen. Andernfalls wäre es schwierig zu verstehen, daß bei der Verschiedenartigkeit der durch UV- und HNO_2 ausgelösten Schäden die gleichen Arten von Reaktivierungsvorgängen auftreten. Der Vergleich des Ausmaßes beider Erscheinungen bei T4 hat jedoch gezeigt, daß sowohl MR als auch KR bei HNO_2 -Inaktivierung erheblich schwächer ausgeprägt sind als bei UV-Inaktivierung; das gleiche gilt für das funktionelle Überleben der Cistren *rII-A* und *rII-B*. Es erschien deshalb interessant, festzustellen, ob die bei allen 3 Phänomenen vorhandenen Unterschiede *quantitativ* auf eine gemeinsame Ursache zurückgeführt werden können. Wie im folgenden gezeigt wird, ist dies tatsächlich möglich.

Die in Abschnitt 4 mitgeteilten Ergebnisse sprachen bereits dagegen, daß die Ursache für die geringere KR in einer herabgesetzten Rekombinationsfähigkeit der HNO_2 -inaktivierten Phagen zu suchen ist. Auch die bei HNO_2 -Einwirkung gegenüber UV geringeren Werte für das funktionelle Überleben der Cistren *rII-A* und *rII-B* wären nicht auf diese Weise zu erklären, weil die Funktionsfähigkeit dieser beiden Cistren gar keine Rekombination voraussetzt (KRIEG 1959). Dagegen ist die Annahme, daß sich bei HNO_2 -inaktivierten Phagen in vielen Fällen der Schaden bereits so frühzeitig im Infektionsverlauf auswirkt, daß sie gar nicht die entsprechenden Stadien für KR bzw. Ausübung der *rII*-Funktion erreichen, zur Erklärung der experimentell festgestellten Unterschiede hinreichend. Unter dieser Annahme kann der Phagenprozensatz, der bei der jeweiligen HNO_2 -Dosis das kreuzungsreaktivierbare Stadium erreicht, ausgedrückt werden durch

$$V_{KR} = \frac{\text{KR bei } \text{HNO}_2\text{-Inaktivierung}}{\text{KR bei einer trefferzahlgleichen UV-Inaktivierung}}$$

wobei als KR die Differenz zwischen dem Marker-Überleben und dem Überleben des Gesamtphagen als reproduktionsfähige Einheit bezeichnet wird.

Ebenso kann der Phagenprozensatz, der bei der jeweiligen HNO_2 -Dosis noch in der Lage ist, die Funktion des *rII-A* bzw. *rII-B*-Cistrons auszuüben, ausgedrückt werden durch

$$V_{rII-A} = \frac{\text{Funktionelles Überleben des } rII\text{-A-Cistrons bei } \text{HNO}_2\text{-Inaktivierung}}{\text{Funktionelles Überleben des } rII\text{-A-Cistrons bei einer trefferzahlgleichen UV-Inaktivierung}}$$

und

$$V_{rII-B} = \frac{\text{Funktionelles Überleben des } rII\text{-B-Cistrons bei } \text{HNO}_2\text{-Inaktivierung}}{\text{Funktionelles Überleben des } rII\text{-B-Cistrons bei einer trefferzahlgleichen UV-Inaktivierung}}$$

Die Werte für V_{KR} , V_{rII-A} und V_{rII-B} sind in Abb. 6 als Funktion der HNO_2 -Dosis wiedergegeben. Die Werte sind weitgehend gleich und fallen exponentiell

mit der Dosis ab, wobei die Neigung etwa $\frac{1}{6}$ der der Überlebenskurve der freien Phagen beträgt. Hieraus kann folgendes geschlossen werden: Durchschnittlich jeder sechste HNO_2 -Letaltreffer blockiert den Phagen bereits in einem Stadium, das vor der Kreuzungsreaktivierung und vor der Ausübung der *rII*-Funktionen liegt.

Mit der in Abb. 6 dargestellten Berechnung stimmen auch die in Abschnitt 4 mitgeteilten Versuchsergebnisse bezüglich KR nach kombinierter UV- und HNO_2 -Inaktivierung quantitativ gut überein. Die experimentellen Werte (Tabelle 1) lagen bei 30 min HNO_2 -Einwirkung um das 6–8fache tiefer als die erwarteten, wobei die Werte um 8 sicherlich die richtigeren sind, da die KR-Kurve oberhalb 15 min flacher verläuft als zwischen 12 und 15 min, was jedoch nicht berücksichtigt wurde. Aus Abb. 6 entnehmen wir für 30 min HNO_2 -Einwirkung, daß der Bruchteil der Phagen, die in das kreuzungsreaktivarbare Stadium kommen, 10–11% beträgt, während der Faktor 8 einem Wert von 12,5% entsprechen würde. Dieser geringfügige Unterschied liegt innerhalb der experimentellen Genauigkeitsgrenzen.

Für die Ermittlung der Kreuzungsreaktivierung und des funktionellen Überlebens der *rII*-Cistren war eine experimentelle Voraussetzung, daß die inaktivierten Phagen einzeln infizieren. Daraus ergab sich die Berechtigung, V_{KR} , V_{rII-A} und V_{rII-B} gleichzusetzen mit dem Prozentsatz der Phagen, die das betreffende intrazelluläre Stadium noch erreichen können. Bei der Multiplizitätsreaktivierung, die durch das Zusammenwirken mehrerer inaktivierter Phagen erfolgt, entspricht dagegen das Verhältnis

$$V_{MR} = \frac{\text{Multikomplex-Überleben bei } \text{HNO}_2\text{-Inaktivierung}}{\text{Multikomplex-Überleben bei einer trefferzahlgleichen UV-Inaktivierung}}$$

nicht unmittelbar dem Prozentsatz der Phagen, die das multiplizitätsreaktivierbare Stadium erreichen, sondern lediglich dem Prozentsatz der Multikomplexe, die in dieses Stadium kommen. Um daraus Rückschlüsse auf die Einzelphagen ziehen zu können, bedarf es der Entscheidung zwischen zwei möglichen Annahmen, nämlich entweder

a) daß als Voraussetzung für die MR mindestens 2 Phagen eines Komplexes in das multiplizitätsreaktivierbare Stadium gelangen müssen oder

b) daß es hinreichend ist, wenn 1 Phage des Multikomplexes das multiplizitätsreaktivierbare Stadium erreicht (weil dieser bereits die zur MR notwendigen intrazellulären Funktionen erfüllen kann).

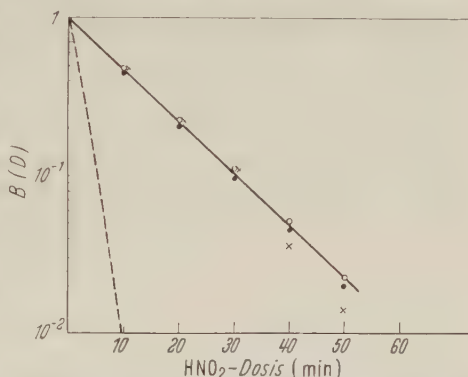


Abb. 6. Bruchteil $B(D)$ der T4-Phagen, der nicht von den frühzeitig wirkenden Letalschäden betroffen ist, als Funktion der HNO_2 -Dosis. Die Werte wurden errechnet aus dem Überleben des *rII-A*-Cistrons (●), dem Überleben des *rII-B*-Cistrons (○) und dem Marker-Überleben in den KR-Experimenten (x). Die gestrichelte Kurve gibt zum Vergleich das Gesamtüberleben des T4-Phagen wieder

Die Annahme b wäre unplausibel, falls der frühzeitig wirkende Schaden bereits den Adsorptions- oder Injektionsvorgang betrifft. Nimmt man wegen der Ähnlichkeit von KR und MR — beide Erscheinungen beruhen auf genetischer Rekombination — an, daß die in Abb. 6 als Funktion der HNO_2 -Dosis dargestellten Phagenprozentsätze identisch sind mit denen, die das multiplizitätsreaktivarbare Stadium erreichen, so kann man unter dieser Voraussetzung die theoretisch zu erwartenden Multikomplex-Überlebensprozentsätze aufgrund der Annahme a und der Annahme b errechnen.

Die Erwartungswerte im Fall b liegen wesentlich höher als die experimentell erhaltenen, während die Erwartungswerte unter der Annahme a recht gut mit den tatsächlichen übereinstimmen. Der Berechnung liegen folgende Überlegungen zugrunde:

Bezeichnet man die bei der Dosis Null festgestellte durchschnittliche Infektionsmultiplizität mit m und die bei der jeweiligen HNO_2 -Dosis für die MR effektive Multiplizität mit $m_{\text{eff.}}(D)$, so gilt die Beziehung

$$m_{\text{eff.}}(D) = m \cdot B(D),$$

wobei mit $B(D)$ der in Abb. 6 wiedergegebene Bruchteil der Phagenpopulation bezeichnet wird.

Will man nun aus den experimentell ermittelten Multikomplex-Überlebenswerten nach UV-Inaktivierung die zu erwartenden Werte bei HNO_2 -Inaktivierung errechnen, so müssen diese jeweils mit einem Faktor multipliziert werden, der sich aus dem Verhältnis der Multikomplexe bei einer Multiplizität $m_{\text{eff.}}$ zu denen bei der Multiplizität m ergibt. Demzufolge betragen die erwarteten Werte

$$\ddot{U}_{Mu} \cdot \frac{1 - (1 + m_{\text{eff.}}) e^{-m_{\text{eff.}}}}{1 - (1 + m) e^{-m}}$$

wenn \ddot{U}_{Mu} das Überleben der Multikomplexe bei UV-Inaktivierung bedeutet.

In Abb. 2 sind die nach dieser Berechnung erwarteten Werte des Multikomplex-Überlebens durch eine gepunktete Kurve verbunden, wobei als Ausgangsmultiplizität $m = 1,5$ gewählt wurde, die den Mittelwert der experimentell bestimmten Multiplizitäten darstellt. Die gute Übereinstimmung der gepunkteten Kurve mit den experimentell festgestellten Multikomplex-Überlebenswerten bei HNO_2 -Inaktivierung deutet sehr darauf hin, daß die ohnehin plausiblere Annahme a zutreffend ist und dem verringerten Ausmaß aller 3 Effekte, MR, KR und funktionelles Überleben der *rII*-Cistren, die gleiche Ursache zugrunde liegt.

Die experimentell erhaltenen Multikomplex-Überlebenswerte bei HNO_2 -Inaktivierung liegen systematisch etwas niedriger (besonders im höheren Dosisbereich) als die Erwartungskurve. Diese Tatsache ist verständlich, da mit zunehmender Dosis (d. h. mit abnehmender $m_{\text{eff.}}$) der Anteil der Multikomplexe aus mehr als 2 „kompetenten“ Phagen sukzessive zugunsten des Anteils der Zweier-Komplexe (die naturgemäß eine geringere Überlebenschance haben als die Komplexe mit mehr Phagen) abnimmt.

Wie bereits erwähnt, läßt das aus Abb. 6 zu entnehmende Verhältnis der Kurvenneigung für $B(D)$ zu der für das Überleben der freien Phagen den Schluß zu, daß etwa $1/6$ der Letaltreffer verhindern, daß der davon betroffene Phage in ein intrazelluläres Stadium gelangt, in dem die *rII*-Funktion ausgeübt werden

und genetische Rekombination stattfinden kann. $\frac{5}{6}$ aller Letaltreffer erlauben jedoch dem Phagen noch das Erreichen dieser Stadien. Da der intrazelluläre Phage nahezu ausschließlich aus DNS besteht (HERSHEY 1955), kann man folgern, daß mindestens $\frac{5}{6}$ aller Letalschäden durch HNO_2 auf Veränderungen der DNS beruhen.

Die in dieser Arbeit wiedergegebenen Experimente lassen dagegen keine Entscheidung darüber zu, ob dies auch für das restliche $\frac{1}{6}$ der Letalschäden zutrifft oder ob es sich hierbei vielleicht um eine Schädigung des Phagenproteins handelt. Für eine Proteinschädigung spräche, daß die Werte in Abb. 6 in ähnlichem Maße abfallen wie die Fähigkeit zur Tötung der Wirtsbakterien (Abb. 5), die ihren Sitz nicht in der Phagen-DNS, sondern in der Phagenproteinhülle („ghost“) hat (HERRIOTT 1951). In diesem Falle wäre es wahrscheinlich, daß die frühzeitig wirkenden Schäden bereits den Adsorptions- oder Injektionsvorgang betreffen. Auch die Ergebnisse der MR-Versuche sprechen mehr für Adsorptions-Injektions-Schäden als für Schäden zeitiger intrazellulärer Funktionen. Eine experimentelle Entscheidung hierüber auf der Basis des Vergleichs zwischen extrazellulärer und intrazellulärer HNO_2 -Inaktivierung der Phagen war nicht möglich, weil die Kapazität der Zellen zur Phagenvermehrung wesentlich empfindlicher gegen HNO_2 ist als der Phage selbst. Es kann lediglich ausgeschlossen werden, daß das bei HNO_2 -Inaktivierung geringere Ausmaß der hier untersuchten Effekte auf einer Verlangsamung der Adsorption und/oder Injektion beruht, denn das Überleben der Multi-komplexe bei HNO_2 -Inaktivierung blieb unverändert, wenn die Adsorptionszeit zwischen 5 und 60 min variiert wurde. Eine endgültige Entscheidung in der Frage, ob die frühzeitig wirkenden Schäden die Adsorption, Injektion oder zeitige intrazelluläre Funktionen betreffen, müßte durch Experimente mit P 32-markierten Phagen möglich sein.

Summary

The inactivation of phage T 4 by nitrous acid (HNO_2) is essentially an exponential function of time of treatment. HNO_2 -inactivated T 4 is able to undergo multiplicity reactivation, and genetic markers may be rescued by live phage, however, the extent of both effects is appreciably less than after UV-inactivation. Also, the survival of phenotypic function of the cistrons *rII-A* and *rII-B* is lower with HNO_2 -treatment than with a UV-irradiation of a corresponding number of hits.

The reduced effects are quantitatively accounted for by the assumption of lethal hits blocking early steps of infection. These early-step damages amount to approximately $\frac{1}{6}$ of the total hit number; it is still unknown whether they occur in DNA or in protein. Some indication for the occurrence in protein comes from the result that the host-killing efficiency of HNO_2 -inactivated phage is reduced at a similar rate as these early-step damages occur. However, at least $\frac{5}{6}$ of the lethal hits are due to chemical changes within the DNA, as can be calculated from the results of multiplicity reactivation, marker rescue, and phenotypic survival of the *rII*-cistrons.

Ich danke Frau BARBARA M. SCHREIBER für die gewissenhafte technische Durchführung der Experimente.

Literatur

- ADAMS, M. H.: Bacteriophages. Appendix: Methods of study of bacterial viruses. New York: Interscience Publ. 1959.
- BENZER, S.: Fine structure of a genetic region in bacteriophage. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **41**, 344—354 (1955).
- BENZER, S.: The elementary units of heredity. In: A symposium on the chemical basis of heredity, p. 70—93. Baltimore: Johns Hopkins Press 1957.
- DOERMANN, A. H., M. CHASE and F. W. STAHL: Genetic recombination in bacteriophage. J. cell. comp. Physiol. **45**, Suppl. 2, 51—74 (1955).
- HERRIOTT, R. M.: Nucleic-acid-free T2 virus „ghosts“ with specific biological action. J. Bact. **61**, 752—754 (1951).
- HERSHEY, A. D.: An upper limit to the protein content of the germinal substance of bacteriophage T2. Virology **1**, 108—127 (1955).
- KAUDEWITZ, F.: Inaktivierende und mutagene Wirkung salpetriger Säure auf Zellen von *Escherichia coli*. Z. Naturforsch. **14b**, 528—537 (1959).
- KRIEG, D.: A study of gene action in ultraviolet-irradiated bacteriophage T4. Virology **8**, 80—98 (1959).
- LURIA, S. E., and M. DELBRÜCK: Interference between inactivated bacterial virus and active virus of the same strain and of a different strain. Arch. Biochem. **1**, 207—218 (1942).
- LURIA, S. E., and R. DULBECCO: Genetic recombinations leading to production of active bacteriophage from ultraviolet inactivated bacteriophage particles. Genetics **34**, 93—125 (1949).
- MUNDY, K. W., u. A. GIERER: Die Erzeugung von Mutationen des Tabakmosaikvirus durch chemische Behandlung seiner Nukleinsäure. Z. Vererb.-Lehre **89**, 614—630 (1958).
- SCHUSTER, H., u. G. SCHRAMM: Bestimmung der biologisch wirksamen Einheit in der Ribonukleinsäure des Tabakmosaikvirus aus chemischem Wege. Z. Naturforsch. **13b**, 697—704 (1958).
- TESSMAN, I.: Mutagenesis in phages Φ X174 and T4 and properties of the genetic material. Virology **9**, 375—385 (1959).
- VIELMETTER, W., u. C. M. WIEDER: Mutagene und inaktivierende Wirkung salpetriger Säure auf freie Partikel des Phagen T2. Z. Naturforsch. **14b**, 312—317 (1959).

Prof. Dr. WALTER HARM, Institut für Genetik,
Abteilung Strahlenbiologie der Universität Köln,
Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 15—17

From the Department of Botany, University of Missouri, Columbia, Missouri

SOME GENETIC INVESTIGATIONS ON *CHLAMYDOMONAS EUGAMETOS**

By

C. SHIELDS GOWANS

With 1 Figure in the Text

(Received March 28, 1960)

Chlamydomonas eugametos was isolated in 1929 by MOEWUS (1931). Although there is some question about the status of *C. eugametos* as a species (GERLOFF 1940, LEWIN 1954), the name will be maintained throughout this article. The male and female wild-type stocks used in this study were obtained in 1953 from G. M. SMITH, who had in turn obtained them directly from MOEWUS.

Materials and Methods

The minimal medium used was the same as given by LEVINE and EBERSOLD (1958), with the single modification that the amount of ammonium nitrate in the BELJERINCK's solution was tripled (1.5 g). For all growth requirement determinations on solid media, washed agar was used (washed 15 times in distilled water, twice in cold 95 percent ethanol, and once in hot 95 percent ethanol).

The complete medium was designed with the aim of supplying every known water soluble growth factor (see Table I).

Stocks were maintained in a room which had an annual temperature variation between 15° and 20° C. under a fluorescent light fixture containing one cool white fluorescent tube (Sylvania or Champion), one warm white (Champion) and one deluxe warm white (Westinghouse). The lights were regulated by a time clock to be on twelve hours, and off twelve hours, and the light intensity was 150 f.c. Zygotes were germinated in a Precision Scientific low temperature cabinet which was equipped with a fluorescent fixture containing fluorescent tubes of the same type as given above, and a time switch giving twelve hours of light and twelve hours of dark. The temperature was 20° C, and the light intensity was 400 f.c. For all other experimental work, continuous illumination of 400 f.c., and the same mixture of fluorescent tubes was used, in a 25° C constant temperature room.

Mutants were isolated after ultraviolet irradiation of cells on the surface of solid complete media in petri dishes. The media were inoculated with 10^4 to 10^5 cells in a distilled water suspension (counts were made by haemocytometer). Irradiation was carried out with a 15 watt Westinghouse Sterilamp W 1—15, which provided 10 ergs/mm²/sec at the irradiation distance used (50 cm). Irradiation was carried out for 4 to 4½ minutes. These times gave from 99 to 99.5% kill. Following irradiation and 12 hours dark treatment (to prevent possible photo-reactivation), the plates were incubated in the light for two weeks to allow surviving cells to produce colonies.

The plates containing clones from surviving cells were replica plated by means of sterile filter paper (EVERSOLE 1956) to minimal media and then to complete media. Following another illumination period of two weeks, the minimal and complete plates were compared, and colonies which grew on complete and did not grow on minimal were transferred to complete slants for further tests. Any colonies which showed abnormal colonial modification were also isolated for further tests.

* This work was conducted in the Department of Biological Sciences at Stanford University, and was supported in part by a Henry Newell Fellowship, and in part by a Research Fellowship (GF-6012) from the National Institutes of Health.

The original screening of mutants was done on an omission series of media. From the pattern of growth on these media, the mutants could be classified as vitamin, nucleic acid, or amino acid requirers (see Table 2). In making these tests, the cells from a mutant clone were suspended in sterile distilled water, allowed to "starve" for 24 hours in the light to deplete the

Table 1

Minimal Medium	Complete Medium
Modified Beijerinck's solution ¹ . . . 10 ml	Yeast extract (Difco dehydrated) 5.0 g
Phosphate buffer ² 10 ml	Casein Hydrolysate (Sheffield
Trace element solution ² 2 g	N-Z-Case) 2.5
Double distilled water 80 ml	Nucleic acid hydrolysate ³ . . . 2.5 ml
	Vitamin solution ⁴ 5.0
	Minimal medium 1000.0

¹ Modified BEIJERINCK'S solution: NH_4NO_3 , 1.5 g; K_2HPO_4 , 0.2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.1 g; and H_2O , 1000 ml.

² The composition of these solutions are given in LEVINE and EBERSOLD (1958).

³ Nucleic Acid Hydrolysate: Yeast nucleic acid (Schwarz), 10 g; Distilled H_2O , 50 ml; 25% NH_4OH , 5 ml. Autoclave one hour at 115°C . Filter, dilute to 100 ml with distilled H_2O (LEVINE and BASS (1931).

⁴ Vitamin Solution: thiamine, 100 mg; riboflavin, 750 mg; pyridoxine, 75 mg; Ca-pantothenate, 200 mg; *para*-aminobenzoic acid, 5 mg; nicotinamide, 75 mg; choline HCl, 200 mg; folic acid, 1 mg; inositol, 1 g; biotin, 50 μg ; B_{12} , 50 μg ; 95% ethanol, 1000 ml (modified from TATUM et al. 1950).

Table 2

Original Omission Series of Media: (for the classification of mutants into vitamin, nucleic acid, or amino acid requirers)	
Medium 1	Complete (see Table 1)
Medium 2	Minimal (see Table 1)
Medium 3	Minimal + casein hydrolysate + nucleic acid hydrolysate + vitamin solution
Medium 4	Minimal + casein hydrolysate + nucleic acid hydrolysate
Medium 5	Minimal + casein hydrolysate + vitamin solution
Medium 6	Minimal + nucleic acid hydrolysate + vitamin solution

(The concentrations of casein hydrolysate, nucleic acid hydrolysate and vitamin solution used in these media, were the same as those used in the complete medium.)

Vitamin Tester Stocks: (for keying out vitamin mutants)					
	1.	2.	3.	4.	5.
1.	riboflavin	thiamine	pyridoxine	pantothenate	PABA
2.		nicotinamide	choline	folic acid	biotin
3.			inositol	glycine	histidine
4.				B_{12}	serine
5.					thymine

(The concentrations of the vitamins in these solutions were 10 X those used in the vitamin solution (see Table 1). Glycine, histidine and serine were added in a concentration of 4 mg/ml of stock solution and thymine in a concentration of 1 mg/ml of stock solution.)

One ml of the Vitamin Tester stock was added to 100 ml of minimal medium to make up the tester medium.

intracellular supply of their unknown requirement and then a small drop of the suspension was placed on media containing each of the members of the omission series. After five days in the light, the spots were scored and the class of compound required by each unknown was

identified. After the original classification, the unknown vitamin mutants were identified further by spotting on five minimal media plates, each of which was supplemented with one of the vitamin tester stocks outlined in Table 2. These vitamin tester stocks were developed after the method described by RYAN (1950). Vitamin stock 1 contains all of the substances below the numeral 1 in a column, and across from the numeral 1 in a row. Vitamin stock 2 contains all of the substances below the numeral 2 in a column, and across from the numeral 2 in a row, etc.

Description of Mutants

Nutritional Mutants. Nicotinamide (*nic*): None of the nicotinamide mutants would utilize nicotinic acid under standard conditions of growth (pH 6.8). The concentration of nicotinamide routinely supplied was 0.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Further characterizations were attempted using suspected precursors to nicotinamide. Anthranilic acid, indole, tryptophan, and kynurenine were tested as well as

Table 3. *Summary of Nutritional Mutants*

Mutant Designation	Nutritional Response
<i>nic-1</i> , (42), (82-2), (158-16), (204-5), (231-2), (223), (238), (124)	Showed positive response to nicotinamide only
<i>nic</i> (22), (127), (171-2), (173-2) .	Showed positive response to nicotinamide and hazy response to kynurenine
<i>nic-2</i>	Showed positive response to nicotinamide, and hazy response to tryptophan, kynurenine, acetyl kynurenine, 3-OH-anthranilic acid and quinolinic acid
<i>nic-3</i>	Growth response like <i>nic-2</i> , but also gave a hazy response to indole
<i>nic</i> (195-2), (204-4)	Showed positive response on nicotinamide, acetyl kynurenine, and quinolinic, and gave hazy response on all others
<i>nic</i> (43-2)	Showed positive response on nicotinamide and kynurenine, and gave a hazy response on acetyl kynurenine, 3-OH-anthranilic acid, and quinolinic acid
<i>pur-1</i> , (130), (146), (55)	Will grow on adenine, hypoxanthine, xanthine or guaninine
<i>thi-1</i>	Requires intact thiamine
<i>cs</i> (173-4), (200-2), (160-8), (196-2), (200-3), (209-1), (111-1), (160-11), (111-5), (219-1), (181-3), (220-3)	Will respond to sodium acetate, glucose, fructose or tris buffer
<i>cs</i> (174-6), (174-3)	Will respond to sodium acetate, glucose, or fructose
<i>os</i> (24), (93-1), (111-4), (173-1), (212-4), (195-6)	Require increased osmotic pressure
<i>pab-1</i> , -2, (128-1), (201-1) . . .	Require <i>para</i> -aminobenzoic acid

filtrates from *Neurospora* mutants which accumulate possible precursors. *Neurospora* filtrates were tested from strains Y 31881 (accumulates acetyl kynurenine), 4540 (accumulates 3-hydroxyanthranilic acid) and 3416 (accumulates quinolinic acid) (BONNER 1951). On the basis of these tests the mutants could be divided into six classes which appeared to have biochemical differences (see Table 3).

Purine (pur): The purine mutants will grow on any purine supplied (adenine, hypoxanthine, xanthine or guanine). One of them (*pur 55*) differs in the concentration of hypoxanthine needed for growth. None of these mutants will grow on 4-amino imidazole 5-carboxamide in concentrations of 1, 10, or 100 $\mu\text{g/ml}$ with or without the addition of folic acid.

Thiamine (thi): The thiamine mutant will grow only on intact thiamine. It has been tested on 2,5-dimethyl 6-aminopyrimidine, on thiazole, and on mixtures of these compounds. The concentration of thiamine routinely supplied was 1.0 $\mu\text{g/ml}$.

para-aminobenzoic acid (*pab*): These mutants are routinely grown on 0.05 $\mu\text{g/ml}$ of PABA.

Carbon-source (cs): The carbon-source mutants were not designated as non-autotrophic mutants, because it seemed contradictory to refer to non-autotrophic mutants in an organism which has been shown to be an obligate autotroph (LEWIN 1950). These mutants will grow on sodium or potassium acetate (2.0 mg/ml), glucose or fructose (10.0 mg/ml). They cannot be tested in the routine manner in which mutants are suspended and allowed to "starve" overnight, since this amount of starvation often kills the cells. If they are suspended in distilled water they never become motile. If they are suspended in fructose solution they are motile, but the rate of movement is slow, and sexually active cells have never been produced. All but two of these mutants will grow on minimal medium containing tris buffer (trihydroxymethyl amino methane) at concentrations of 6.0 mg/ml at both high (8.3) and at normal (6.8) pH. They will not grow on minimal medium buffered with phosphate at high (7.3) or at normal (6.8) pH. Presumably they can utilize the tris buffer as a carbon source.

No amino acid mutants were obtained. This was noted early in the mutation experiments, and special efforts were made to recover this type of mutant. Instead of complete medium, media supplemented with basic amino acids, with arginine only, or with various amino acid mixtures were used without success.

Morphological and Physiological Mutants. High osmotic pressure (*os*): These strains will grow on any media in which supplements are added in high amounts. The simplest medium on which they will grow is minimal medium supplemented with 0.78 mg/ml sodium chloride. When suspended in distilled water the cells become distended, and some burst. Like the *cs* mutants, it has been impossible to cross the osmotic mutants, because they are non-motile in distilled water, and are motile but not sexually active in sodium chloride solution.

Streptomycin resistance (*sr*): Four strains have been isolated from a single plate (unirradiated) containing 50 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin.

Misdividing (*md*): Some of the cells are "siamese twins" which are joined at their posterior ends, having two anterior ends, each of which is provided with a pair of flagella. More bizarre forms have been observed which may have as many as 18 flagella per cell. Each mutant clone contains "twins" and "monsters" as well as some normal cells. Single cell isolates of normal cells from these cultures again produce clones containing "twins" and "monsters". All the forms observed could be explained on the basis of incomplete cell divisions.

Palmella (*palm*): These strains produce large clumps of non-motile cells. The palmella condition is characterized by the daughter cells remaining enclosed in the wall of the mother cell.

Flagella-less (*fl*): This strain shows no motility, and no flagella have been observed.

Paralyzed (*par*): This strain develops flagella when suspended, and the flagella exhibit a twitching motion. The ability to swim, however, is completely lacking.

Lazy (*lazy*): This strain swims at a rate which is markedly slower than that observed in wild-type suspensions.

Twirler (*top*): These strains are characterized by spinning like a top in one spot. Occasionally a cell will progress a short way in a very aberrant fashion, but it soon reverts to a pirouette.

Materials and Methods

To form zygotes, the parental cultures (male and female) were suspended separately in sterile distilled water and illuminated (400 f.c.) for three hours. At the end of this period, the cultures were mixed and illuminated again for one hour. The suspension was then poured onto a petri dish containing minimal medium, and illuminated for 36 hours. The plates were then placed in the dark. After six days of darkness, the zygotes are mature and capable of germination.

Germination of mature zygotes was induced by transferring them to fresh medium and exposing to light. The zygotes were germinated, and the products separated according to the method described by EBERSOLD and LEVINE (1959).

When colonies had developed on the germination plates, they were transferred to sterile distilled water and allowed to "starve" overnight. Each suspension was then spotted on an appropriate omission series of media for identification, and the spot plates were placed in continuous light. Within a week the spots can be scored and the segregants identified (see Fig. 1).

The same suspension was utilized to determine the sex of the segregants. For sex-testing, three drops of the suspension were placed in three different spots on a microscope slide. Standard wild-type male was added to one spot, wild-type female to the second, and the third acted as a control for homothallism or mixed cultures. All three spots were examined routinely under a dissection microscope for the typical clumping reaction.

Genetic Analysis

The genetic information presented here was obtained almost exclusively from tetrad analysis. Tetrads were classified into three types for each gene-gene relationship. From a cross $AB \times ab$, a tetrad in which two of the meiotic products resemble one parent and two the other ($AB AB ab ab$) is called a parental ditype tetrad (PD). A tetrad which has two types of products, neither of which resemble the parents ($Ab Ab aB aB$) is called a non-parental ditype tetrad (NPD). A tetrad where all four products are different, ($AB Ab aB ab$) is called a tetratype tetrad (T).

In the course of this work, the products from more than 800 zygotes were analyzed for the segregation of from one to five genes. No linked genes have been detected, but gene-centromere distances have been computed for 11 genes. The data from 32 different crosses in which two or more genes were segregating are summarized in Table 4. The majority of the data come from crosses which yielded 80 to 100 percent germination. Crosses giving low germination frequencies were

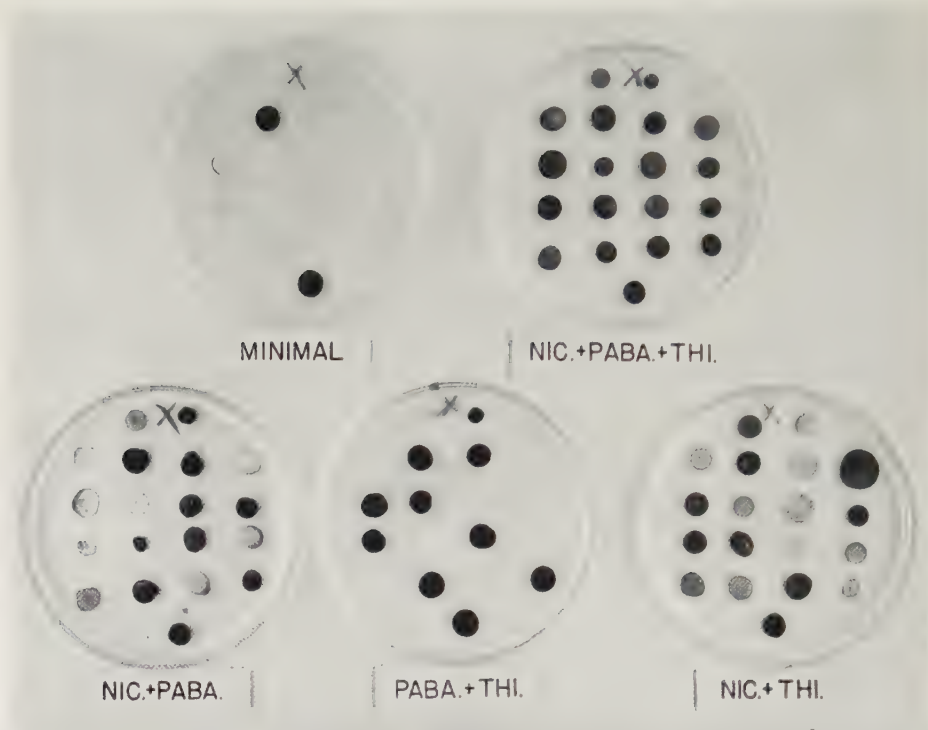


Fig. 1. A typical test for the classification of segregants. The two spots in the first row on each plate are the parental strains. Each of the next four rows contain the four product strains from each of four different zygotes. The spot at the bottom of each plate is a wild-type control

CROSS: *pab (I28-1)* ♀ × *nic-1 thi-1* ♂

Isolate	Requirements			Tetrad Classification		
	THI	NIC	PABA	<i>thi + nic</i>	<i>thi + pab</i>	<i>nic + pab</i>
P ₁ ♂	—	—	—			
P ₂ ♀	—	—	—			
Zygote 1-1	—	—	—			
-2	+	+	+	PD	T	T
-3	+	+	—			
-4	—	—	+			
Zygote 2-1	—	+	+	NPD	T	T
-2	—	+	—			
-3	+	—	—			
-4	—	—	—			
Zygote 3-1	—	+	+	T	T	T
-2	+	—	+			
-3	+	+	—			
-4	—	—	—			
Zygote 4-1	—	—	+	PD	PD	PD
-2	+	+	—			
-3	—	—	+			
-4	+	+	—			
Control ♀	+	+	+			

not analyzed extensively. The germination frequency for all of the data in Table 4 is 96.8 percent.

In Table 4 gene-gene relationships are given at the intersection of appropriate columns. Information obtained from tetrads in which only three products were identified was included with complete tetrads, since the loss of the fourth product was usually due to random fungus contamination.

Single strand data were collected from zygotes in which only one product was analyzed. This was the practice when the meiotic products had undergone several

Table 4. *Summary of Gene-Gene Relationships from all Crosses*

	<i>nic-1</i>	<i>pab-1</i>	<i>thi-1</i>	<i>sex</i>	<i>pur-1</i>
<i>nic</i> (42)	not alleles			0:1:5	
<i>nic</i> (22)	not alleles				
<i>nic</i> (127)	not alleles				
<i>nic</i> (171-2)	11:10:2				
<i>nic-2</i>	not alleles	15:21:3 0:2 (2):0 4:10	15:23:1 1 (1):1 (1):0 4:10	11:13:6 0 (1):2 (1):0 7:7	
<i>nic-3</i>		1:4:45 0:0 (1):0 21:21	5:2:42 0:0 (1):0 29:13	7:5:38 0:0 (1):0 28:14	
<i>pab</i> (128-1)	2:1:2			2:1:3	
<i>pab-1</i>	175:175:40 11 (20):11 (42):4 56:53	—	224:212:43 22 (24):16 (28):3 86:79	156:192:109 11 (25):16 (21):16 71:92	
<i>pab-2</i>	9:10:22 0:0:2 0:1		7:8:25 0:1:1 0:1	9:8:21 0:0:1 1:0	
<i>thi-1</i>	199:180:65 10 (39):13 (22):4 63:47	—	—	170:189:147 10 (21):9 (32):18 79:85	
<i>sex</i>	153:165:120 6 (31):9 (23):16 38:70	—	—	—	
<i>pur-1</i>	10:6:6	12:5:5	7:10:5	6:7:8	
<i>pur</i> (55)					not alleles

PD:NPD:T (from 4- and 3-product tetrads). PD(PD or T):NPD (NPD or T):T (from 2-product tetrads). Parentals: Recombinants (Single Strand).

mitotic divisions before being separated. When this occurred, a single cell was selected at random and separated from the other cells. A single strand analysis was carried out on clones resulting from these single cell isolations. The data obtained by this method is given in the third row under each gene-gene relationship (Parentals:Recombinants), however this information was not used in any of the calculations of gene-centromere map distances.

Two product data are given in the second row under each gene-gene relationship. The loss of two products was generally (with the exception of crosses containing

the *pur-1* gene) due to fungus contamination. In dealing with two-product tetrads, when it is certain that the two products recovered are different products of the same meiosis and not mitotic sister cells, the genotype of the entire tetrad can be established in a certain number of cases, but not in others, depending on the number of marker genes segregating. This is in contrast to the situation where

Table 5. *Gene-Centromere Map Distances*

Gene	Map Distance	Exchange Frequency	Method of Computation (see text)	Tetratype/ Total Ratio
<i>nic-1</i>	4.2	0.0843	Method I <i>nic-1 pab-1</i> <i>pab-1 thi-1</i> <i>nic-1 thi-1</i>	40/390
<i>pab-1</i>	1.0	0.209		43/479
<i>thi-1</i>	3.5	0.0711		65/444
<i>sex</i>	11.1	0.2210	Method I <i>nic-1 pab-1</i> <i>pab-1 sex</i> <i>nic-1 sex</i>	40/390 109/457 120/438
	11.1	0.2246	Method II vs. <i>pab-1</i>	109/457
<i>nic-2</i>	2.9	0.0578	Method II vs. <i>pab-1</i>	3/39
<i>nic-3</i>	45.4	0.9075	Method II vs. <i>pab-1</i>	45/50
<i>pab-2</i>	29.2	0.5832	Method I <i>nic-1 pab-2</i> <i>pab-2 thi-1</i> <i>nic-1 thi-1</i>	22/41 25/40 65/444
	31.0	0.6200	Method II vs. <i>thi-1</i>	25/40
<i>nic (171-2)</i>	0.2	0.0031	Method II vs. <i>nic-1</i>	2/23
<i>pur-1</i>	10.6	0.2131	Method II vs. <i>pab-1</i>	5/22
<i>nic (42)</i>	45.8	0.9159	Method II vs. <i>sex</i>	5/6
<i>pab (128-1)</i>	18.1	0.3614	Method II vs. <i>nic-1</i>	2/5
	20.9	0.4173	Method II vs. <i>sex</i>	3/6

or T):T. This information was not used for computing gene-centromere distances except in the case of *pur-1*. In this cross, four products were separated from each zygote, but in each case two of the four products died and failed to form colonies. None of the surviving clones required purine supplements for growth, so it was assumed that the two products which did not survive contained the *pur-1* allele. Because of this selection against *pur-1*, it was possible to infer with certainty the gene-gene relationship of *pur-1* with the other four markers in all 21 zygotes.

The map distance between 11 genes and their respective centromeres is given in Table 5. In the computation of these map distances, two different methods

three products are recovered, in which case the genotype of the fourth product can be inferred with certainty. Thus, the gene-gene relationship (PD, NPD or T) from two product tetrads can be inferred with certainty in a certain number of cases. In those cases where the gene-gene relationship can not be inferred with certainty, one type of gene-gene relationship can always be excluded (we can say that the relationship is either PD or T in some cases, or that it is either NPD or T in other cases). The second row of figures under each gene-gene relationship in Table 4 contains the number of these partially inferred gene-gene relationships in parentheses. The information is given as follows: PD (either PD or T):NPD (either NPD

were used. To compute the first three distances (*nic-1*, *pab-1*, and *thi-1*), the algebraic solutions of the three simultaneous equations given by WHITEHOUSE (1950) were used (Method I).

Once the exchange frequency (number of tetrads with exchanges divided by total number of tetrads) between the genes *nic-1*, *pab-1*, and *thi-1*, and their respective centromeres had been established, subsequent calculations of exchange frequencies between other genes and their centromeres were made with the following simpler formula:

Method II:

$$x = \frac{2(p-y)}{2-3y}$$

(This formula is a rearrangement of the formula given by PERKINS [1949]).

Where: x = unknown exchange frequency between gene A and centromere.

p = % tetratypes between unmapped gene A and mapped gene B.

y = exchange frequency between gene B and centromere.

In all cases where method II was used, the mapped gene (B) chosen in the cross was the one which was closest to its centromere, and which thus gave the smallest exchange frequency (y). A gene close to its centromere generally acts as a centromere marker, and, therefore, a marker of first division segregation. Both method I and II were applied in the computation of gene-centromere distances of *sex* and *pab-2* (Table 5). The map distances obtained by the two different methods are completely comparable.

Discussion

In tetrad analysis, linkage is detected by a significant excess of PD over NPD tetrads (PERKINS 1953). If genes are independent, one expects the PD/NPD ratio to approximate 50/50. No linkage has been detected in this work, but an excess of NPD tetrads has occurred in the case of *sex* and *pab-1*. The ratio of PD/NPD is 156/192 (Table 4). This is a deviation from the expected 174/174 which is significant at about the 5% level.

Other cases of excess NPD's between non-linked genes have been reported in *Chlamydomonas*. HARTSHORNE (1955) gives ratios in *C. reinhardi* for segregations between presence or absence of eyespot (*ey*) and slowgrowing (*sg*). He finds 59 PD/83 NPD, which is a deviation from expected on the 4% level. SAGER (1955) gives data, also from *C. reinhardi*, obtained from segregations of mating type (*mt*) and presence or absence of chlorophyll in dark-grown cells (y_1) of 59 PD/81 NPD. This deviation from expected approaches the 5% level. Excesses of NPD's between linked genes have also been reported in *Chlamydomonas* by EBERSOLD (1956) and by EVERSOLE and TATUM (1956), however, a more extensive study (EBERSOLD and LEVINE 1959) failed to produce this excess of NPD's.

An exchange frequency of 90.88% is calculated for *nic-3* with its centromere. This was computed from a tetratype frequency of 90.0% between *nic-3* and *pab-1*. PERKINS (1955) has pointed out that tetratype frequencies exceeding 2/3 can be used along with *Drosophila* attached-X recessive homozygosis frequencies which exceed 1/6 as evidence that sister-strand exchanges do not participate in chiasma interference on an equal basis with non-sister strand exchanges. He summarizes other cases in tetrad analysis where tetratype frequencies exceed 2/3. Three of these cases are found in *C. reinhardi*.

PERKINS (1955) also points out that the same result could be obtained if centromeres were usually postreduced for one bivalent and prereduced for the other. Since *pab-1*, by calculations involving several other genes, is usually prereduced along with its centromere, one would assume on the above hypothesis that the centromere with which *nic-3* is associated is usually postreduced. If centromere postreduction is not the explanation, one could assume a nearly obligate crossover between centromere and locus with a very strong chiasma interference (BARRATT, NEWMAYER, PERKINS and GARNJOBST 1954, p. 12).

MOEWUS (1938) reported that the male and female sex-determiners (M and F) of *Chlamydomonas eugametos* were not alleles, but were closely linked genes. As a result of crossing-over between the two loci, he obtained homothallic segregants in approximately 3% of the zygotes germinated. He further reports that if crossing-over occurred at the two-strand stage of meiosis, all four products of the zygote were homothallic. If it occurred at the four-strand stage, a three product zygote was produced, one product being female, one being male and the third being homothallic (MOEWUS 1948). No homothallics were obtained from the more than 800 zygotes germinated during the course of the present work. In a few cases clones gave positive tests to both male and female tester stocks, as well as clumping with themselves, but when these were subsequently purified by streaking, two separate sexes were always recovered. A very few zygotes yielded only three products. Special care was taken in sex-testing the three clones from such zygotes and all gave clear cut male or female tests. It is possible that under these culture conditions zygotes in which crossing-over had taken place in the F—M region (of MOEWUS) did not germinate, and it would be impossible to rule this objection out unless 100 percent germination were obtained for several hundred zygotes.

MOEWUS (1949) obtained tetratype gene-gene relationships only when he was dealing with linked genes. When he was dealing with non-linked genes he obtained only ditype tetrads (see cross D and E in MOEWUS 1949). Since all of the crosses in this study involved relationships between apparently non-linked genes, and since tetratype relationships were obtained between all pairs of genes examined, the results of this study are in disagreement with the results of Moewus.

Summary

Genetic studies have been made with the unicellular green alga *Chlamydomonas eugametos*, starting with wild-type stocks originating from MOEWUS.

Mutant strains were obtained by a replica-plating technique following ultraviolet irradiation. Nutritional mutants include strains requiring carbon-sources, nicotinamide, *para*-aminobenzoic acid, thiamine, and purines. Morphological and physiological mutants were characterized by loss or paralysis of flagella, twinning, requirement for high osmotic pressure, and streptomycin resistance.

Studies on crossing-over have been done almost exclusively by means of tetrads. Some 3000 segregants from over 800 zygotes have been characterized in crosses where from 1 to 5 genes were segregating. Equations for computing gene-centromere distances have been applied and 11 gene centromere distances have been computed.

No linkage has been detected. An excess of non-parental ditype tetrads was obtained in the case of two marker genes. Tetratype frequencies in excess of two-thirds have been found.

No evidence has been found to support MOEWUS' report that sex determination involves non-allelic genes. Moreover, tetratype segregations have been observed for non-linked genes, contrary to MOEWUS' published data.

Acknowledgements. The advice of Drs. DAVID D. PERKINS and W. T. EBERSOLD is greatly appreciated.

Literature

- BARRATT, R. W., D. NEWMAYER, D. D. PERKINS and L. GARNJOBST: Map construction in *Neurospora crassa*. *Advanc. Genet.* **6**, 1 (1954).
- BONNER, D.: Gene-enzyme relationships in *Neurospora*. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **16**, 143 (1951).
- EBERSOLD, W. T.: Crossing-over in *Chlamydomonas reinhardi*. *Amer. J. Bot.* **43**, 408 (1956).
- EBERSOLD, W. T., and R. P. LEVINE: A genetic analysis of linkage group I of *Chlamydomonas reinhardi*. *Z. Vererb.-Lehre* **90**, 74 (1959).
- EVERSOLE, R. A.: Biochemical mutants of *Chlamydomonas reinhardi*. *Amer. J. Bot.* **43**, 404 (1956).
- EVERSOLE, R. A., and E. L. TATUM: Chemical alteration of crossing over frequency in *Chlamydomonas*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **43**, 68 (1956).
- GERLOFF, J.: Beiträge zur Kenntnis der Variabilität und Systematik der Gattung *Chlamydomonas*. *Arch. Protistenk.* **94**, 311 (1940).
- HARTSHORNE, J. N.: Multiple mutation in *Chlamydomonas reinhardi*. *Heredity* **9**, 239 (1955).
- LEVINE, P. A., and L. W. BASS: *Nucleic acids*. New York: Chemical Catalog Co. 1931.
- LEVINE, R. P., and W. T. EBERSOLD: The relation of calcium and magnesium to crossing-over in *Chlamydomonas reinhardi*. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 631 (1958).
- LEWIN, J. C.: Obligate autotrophy in *Chlamydomonas moewusii* Gerloff. *Science* **112**, 652 (1950).
- LEWIN, R. A.: Sex in unicellular algae. Sex in microorganisms, D. H. Wenrich (Ed.) 1954.
- MOEWUS, F.: Neue Chlamydomonaden. *Arch. Protistenk.* **75**, 284 (1931).
- MOEWUS, F.: Vererbung des Geschlechts bei *Chlamydomonas eugametos* und verwandten Arten. *Biol. Zbl.* **58**, 516 (1938).
- MOEWUS, F.: Über die Erblichkeit des Kopulationsverhaltens bei *Chlamydomonas*. *Z. Naturforsch.* **3b**, 279 (1948).
- MOEWUS, F.: Zur biochemischen Genetik des Rutins. *Port. Acta biol. A. R. Goldschmidt Vol.*, **S. 169** (1949).
- PERKINS, D. D.: Biochemical mutants in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Genetics* **34**, 607 (1949).
- PERKINS, D. D.: The detection of linkage in tetrad analysis. *Genetics* **38**, 187 (1953).
- PERKINS, D. D.: Tetrads and crossing-over. *J. cell. comp. Physiol. Suppl.* **2**, 119 (1955).
- RYAN, F. J.: Selected methods of *Neurospora* genetics. *Meth. med. Res.* **3**, 51 (1950).
- SAGER, R.: Inheritance in the green alga *Chlamydomonas reinhardi*. *Genetics* **40**, 476 (1955).
- TATUM, E. L., R. W. BARRATT, N. FRIES and D. BONNER: Biochemical mutant strains of *Neurospora* produced by physical and chemical treatment. *Amer. J. Bot.* **37**, 38 (1950).
- WHITEHOUSE, H. L. K.: Mapping chromosome centromeres by the analysis of unordered tetrads. *Nature (Lond.)* **165**, 893 (1950).

Departments of Zoology, Universities of Melbourne and Tasmania

THE MUTAGENIC ACTIVITY OF SOME PYRROLIZIDINE ALKALOIDS IN *DROSOPHILA*

By

A. M. CLARK

With 1 Figure in the Text

(Received February 21, 1960)

The pyrrolizidine alkaloids are esters of complex carboxylic acids with amino alcohols such as heliotridine (I), retronecine (II) or platynecine (III) (Fig. 1). First detected in the composite *Senecio*, they have since been found in some of the *Leguminosae* and *Boraginaceae*. WARREN (1955) lists their known distribution

in the plant world and also reviews the considerable amount of work which has been done to elucidate their chemical nature. Certain of the alkaloids have been implicated as the toxic agents responsible for liver damage in grazing stock (BULL 1954; BULL, DICK, KEAST and EDGAR 1956), and there is also evidence suggesting that some of them may be carcinogenic (SCHOENTAL and HEAD 1955; SCHOENTAL and MAGEE 1957).

In view of their marked biological activity, it was decided to test some of these alkaloids for possible mutagenic properties. The first experiments were made with heliotrine from *Heliotropium europaeum* and indicated that this particular compound is an extremely potent mutagen in *Drosophila melanogaster* (CLARK 1959). A programme of screening further members of the group has now been undertaken, in the hope that it may prove possible to establish some correlation between mutagenic activity and chemical structure. The alkaloids have

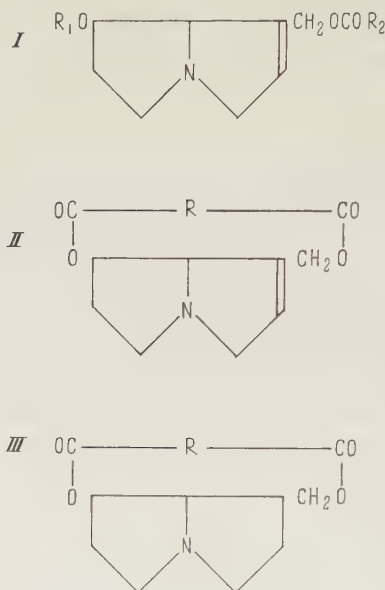


Fig. 1. The basic structure of the pyrrolizidine alkaloids

been the object of intensive study by a group of chemists in the Industrial Chemistry Division of the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, and many of them have become available in a purified state. A detailed analysis of the nature of the genetic effects produced by these mutagens will be presented in later papers. The present communication reports the results of the initial survey of nine of the alkaloids and is intended to direct the interests of geneticists towards this remarkable group of compounds.

Material and Methods

To test the mutagenic activity of the alkaloids in *Drosophila melanogaster*, the Muller-5 technique for sex-linked recessive lethals was used. The alkaloids were dissolved in 0.7 per cent sodium chloride at a standard concentration of 0.02 M. As only small quantities of the purified materials were available, the required amounts were weighed out on a glass fibre torsion balance. The solutions were then prepared in small tubes by adding the appropriate volume of saline by means of an Agla micrometer syringe. In some cases it was necessary to add a small amount of 0.1 M hydrochloric acid to achieve complete solution of the alkaloid, the p_H being adjusted to about 6.2 just prior to use. Whenever this was necessary, allowance was made for the additional volume of liquid to ensure that the final concentration of the alkaloid was still 0.02 M.

A standard volume of 0.08 microlitres of the solution was injected into the abdomen of 24-hour old Canton S males, from 15 to 20 flies being used in each experiment. The injected flies were then mated individually with three Muller-5 virgin females, fresh females being provided at intervals of 72 hours until four successive broods had been obtained. All cultures were maintained at 25° C and suspected lethals were checked and either confirmed or rejected in an F3 generation. In the case of those alkaloids which, on injection, resulted in little or no decline in fertility, no attempt was made to set up in culture all the F1 material. This incomplete sampling introduces a possible source of error, for YANDERS (1958) has shown that females heterozygous for a recessive lethal may develop more slowly than females lacking the lethal. This means that there will be a non-random distribution of lethals between successive groups of offspring emerging in the F1 cultures on consecutive days. To achieve freedom from bias, the cultures need to be sampled to exhaustion. However, for the purposes of rapid screening of many alkaloids, this source of error has been disregarded, for it is likely to be serious only when dealing with weak mutagens and marginal effects. In the case of the more potent mutagens such as heliotrine, lasiocarpine and monocrotaline, there is a considerable degree of sterilization of the injected males and in these cases it is necessary to utilise all available F1 material to obtain reasonable sample sizes.

Results

The results of the tests on nine alkaloids are given in Table 1. Not all broods are represented in each experiment owing to the partial sterilizing effect exerted by some of the alkaloids. For convenience, the data can be grouped into three

Table 1. *Sex-linked recessive lethals from Canton S males injected with 0.02 M solutions of pyrrolizidine alkaloids*

Alkaloid	Brood			
	1	2	3	4
Monocrotaline . .	45/209 (21.6%)	35/190 (18.4%)	—	—
Lasiocarpine . . .	27/199 (13.6%)	26/186 (14.0%)	—	—
Heliotrine	30/252 (11.8%)	28/221 (12.7%)	—	—
Echinatine	14/177 (7.9%)	12/142 (8.4%)	5/99 (5.0%)	0/65
Echimidine	11/165 (6.7%)	9/184 (4.9%)	3/111 (2.7%)	0/75
Senecionine . . .	12/241 (5.0%)	9/210 (4.3%)	1/84 (1.2%)	—
Supinine	7/219 (3.2%)	6/155 (3.9%)	2/170 (1/2%)	0/123
Jacobine	3/286 (1.1%)	2/172 (1.2%)	0/151	0/113
Platyphylline . .	1/255 (0.4%)	5/207 (2.4%)	0/189	1/163 (0/6%)
Heliotric acid . .	2/238 (0.8%)	2/244 (0.9%)	0/176	0/118
Heliotridine . . .	0/232	1/299 (0.3%)	1/311 (0.3%)	0/160

classes, the potent mutagens yielding lethal rates in excess of 10 percent, the moderate mutagens with yields in the range of 4 percent to 10 percent, and weak mutagens producing less than 4 percent sex linked lethals. Of those tested so

far, monocrotaline has proved to be the most active. In some cases, the response obtained from individual males towards this mutagen has been greater than 30 percent lethal rate.

The absence of offspring from the later broods of flies injected with monocrotaline, lasiocarpine or heliotrine suggests that these three alkaloids can act as potent mitotic poisons and so block the process of spermatogenesis. The block appears to be irreversible, for the flies which failed to yield third and fourth broods showed no signs of recovering fertility when tested over a further interval of fifteen days.

In spite of the partial sterilizing effect exerted by some of the alkaloids, toxicity to adult male *Drosophila* is low. In the case of heliotrine, which has been most closely studied so far, more than 80 percent of males injected survive for at least fifteen days, although only two broods can be obtained. It may be noted here that these two broods can still be obtained even if an interval of a week is allowed to intervene between injection and test-mating. There is no indication of a cumulative spermicidal action. Even with saturated solutions of heliotrine (about 0.05 M), there is more than 50 percent survival for at least one week, but males injected with this concentration of the alkaloid yield only a single brood, in which lethal rates in excess of 20 percent are obtained.

These observations raise the possibility that some of the alkaloids might prove to be of value in the control of insect pest populations by the method of releasing in the field large numbers of sterile males. Heliotrine and monocrotaline have both been found to be mutagenic when fed to adult *Drosophila*, but are highly toxic to developing larvae (unpublished observations).

The N-oxides of monocrotaline, lasiocarpine, heliotrine and supinine were also available. In general, the N-oxides of the pyrrolizidine alkaloids show diminished basic properties and are more readily soluble in water. The data in Table 2 show that, in each case, they are less active as mutagens than the parent

Table 2. *Mutagenic activity of some alkaloids and their N-oxides*

Alkaloid	Brood			
	1	2	3	4
Monocrotaline	45/209 (21.6%)	35/190 (18.4%)	—	—
N-oxide	15/120 (12.5%)	13/137 (9.5%)	5/118 (4.2%)	2/106 (1.9%)
Lasiocarpine	27/199 (13.6%)	26/186 (14.0%)	—	—
N-oxide	3/115 (2.6%)	2/155 (1.3%)	1/209 (0.5%)	0/158
Heliotrine	30/252 (11.8%)	28/221 (12.7%)	—	—
N-oxide	22/376 (5.8%)	11/174 (6.3%)	3/151 (2.0%)	0/103
Supinine	7/219 (3.2%)	6/155 (3.9%)	2/170 (1.2%)	0/123
N-oxide	0/183	1/266 (0.4%)	0/221	0/124

alkaloids. This fact needs to be kept in mind when attempting to evaluate the mutagenic hazards to which plant-eating animals are exposed as a result of feeding upon *Heliotropium*, *Senecio* or *Crotalaria*, for according to CROWLEY and CULVENOR (1956), a high proportion of the alkaloids occur in nature as N-oxides. MCKENZIE (1958) finds the N-oxides of some of the alkaloids to be almost devoid of anti-cholinergic properties as compared with their parent bases, while BULL,

DICK and McKENZIE (1956) report them to be less toxic to laboratory rats, so a generally lower level of biological activity appears to be the rule for these derivatives.

In the Canton S line, there seems to be a distinct sex difference in the toxic and anti-mitotic effects of these alkaloids, the females showing appreciably greater sensitivity. Unsuccessful attempts were made to test the mutagenicity of heliotrine when applied to spermatozoa contained within the spermathecae of inseminated females. The females were invariably rendered quite infertile by either injection or feeding techniques and failed to deposit any eggs at all. It seems likely that the anti-mitotic action of the alkaloid completely prevents the maturation of the oocytes.

No special observations have yet been made to detect mosaicism and delayed mutation after treatment of males with any of the alkaloids. However, the relatively frequent occurrence of F₂ cultures containing just two or three wild type males amongst a total fly population of more than fifty suggests that mosaicism is likely to be found.

Discussion

Most alkaloids which are pharmacologically active in the higher animals act on the central nervous system, but the pyrrolizidine alkaloids appear to have a selective hepatotoxic action. This may, of course, be the consequence of the role played by the liver in detoxifying processes generally and it is possible that the damage is caused by some metabolic product rather than by the alkaloid itself. The question has been raised (CLARK 1959) as to whether the mutagenic activity is a property of the molecule as a whole, or whether it is due to some degradation product resulting from enzymatic splitting of the alkaloid. This possibility was tested in a preliminary way by trying to obtain a hydrolysis of the ester linkage of heliotrine with the aid of *Drosophila* haemolymph and homogenates. Very easy separations of heliotrine from heliotric acid and heliotridine can be achieved on paper chromatograms, using butanol mixtures as solvents. The spots can be rendered visible by exposing the chromatogram to iodine vapour (CULVENOR 1954). However, no evidence for splitting of the heliotrine molecule was obtained. In conjunction with the observations of the feeble mutagenicity of heliotric acid and the apparent inactivity of heliotridine, this leads to the conclusion that the mutagenic property is an attribute of the alkaloid molecule as a whole. It may be noted that in a study of the pharmacological properties of some of these alkaloids, McKENZIE (1958) has found that the anticholinergic activity of heliotrine depends upon the presence of the intact ester molecule. The two hydrolysis fragments are inactive. It is also known that neither heliotridine nor heliotric acid are hepatotoxic.

CHRISTIE (1958) has studied some of the biochemical changes occurring in rat liver in cases of acute poisoning by heliotrine and has observed the sudden disorganization of the Krebs tri-carboxylic acid cycle and the loss of activity of those respiratory enzymes linked with Co-Enzyme I (diphosphopyridine-nucleotide). However, these changes are not specific to heliotrine poisoning and hence do not provide any clear indication of the nature of those biochemical events primarily affected by the alkaloids, and which culminate in mutation or chromosome breakage. BULL (1955) has commented upon the greatly enlarged nuclei

observed in cases of chronic poisoning by pyrrolizidine alkaloids and CHRISTIE has noted abnormal structural features proceeding in rat liver nuclei well before the onset of the biochemical changes previously mentioned. It would therefore seem likely that these biochemical changes are effects rather than immediate causes. The primary seat of action may well be within the nucleus itself.

Comparison of the mutagenic activities of heliotrine with echinatine and of lasiocarpine with echimidine indicates that in both instances, the replacement in the acid part of the molecule of a hydroxyl group by the methoxy grouping results in an increase in mutagenicity. A second comparison of interest is the appreciable activity of senecionine and the feeble activity of platyphylline. In this case, the sole difference is the absence of the 1:2 double bond in the pyrrolizidine ring of platyphylline.

In Table 3, comparison is made between the relative potencies of some of the alkaloids with respect to anti-cholinergic properties in the rat and mutagenic

Table 3. *Relative biological activities of pyrrolizidine alkaloids (lasiocarpine = 1)*

	Anti-cholinergic action in the rat	Mutagenic activity in <i>Drosophila</i>
lasiocarpine . .	1.0	1.0
heliotrine . . .	3.0	0.9
senecionine . . .	3.4	0.4
monocrotaline . .	0.07	1.6
jacobine	0.3	0.08
supinine	78	0.2
heleurine	170	
platyphylline . .	1000	0.07
(atropine). . . .	5300	—

activity in *Drosophila*. The figures for anti-cholinergic properties are taken from MCKENZIE (1958). The absence of any parallel between pharmacological activity and mutagenicity is apparent, and is emphasised especially by the fact that platyphylline shows about 300 times the anti-cholinergic activity of senecionine, although it is considerably less active as a mutagen. Platyphylline is not hepatotoxic and it may well be that both hepatotoxicity and strong mutagenicity are dependent upon the presence of the double bond in the pyrrolizidine ring.

There is still insufficient evidence to justify any further tentative conclusions relating mutagenic activity with chemical configuration. There is, of course, the strong possibility that differences in activity are the consequence of differences in ease of penetration rather than of reactivity with the genetic material. However, the fact that a wide range of activities has been observed is in itself encouraging and suggests that extension of the survey is worth while. A further fifteen alkaloids are now available and will be tested in future work.

Apart from the fact that they provide yet another series of chemicals known to be mutagenic in *Drosophila melanogaster*, the pyrrolizidine alkaloids are of interest because of their possible association with cancer of the liver. In a review of the problem of primary cancer of the liver, BERMAN (1958) concludes that pre-existing liver damage, including hepatic cirrhosis, is closely associated with the malignant process, but that chronic malnutrition and other as yet undetermined dietary and environmental factors may play a decisive role in the aetiology. He mentions the pyrrolizidine alkaloids as possible contributory factors in this respect.

Irrespective of whether they live in Europe, Asia or Africa, primary cancer of the liver is of rare occurrence in peoples of Western Europe and North America. By contrast, it is remarkably common in certain parts of Africa and South-East Asia. According to BERMAN, only about 1.2 percent of all deaths due to cancer in European populations are the result of liver cancer. The corresponding figures for Javanese and Bantu populations are 41.6 percent and 50.9 percent respectively.

COOK, DUFFY and SCHOENTAL (1950) have drawn attention to the use that is made of extracts of *Senecio* as herbal remedies by certain South African tribes showing a high incidence of liver cancer. These authors demonstrated the production of primary liver tumours in laboratory rats following feeding with *Senecio* extracts. Preparations of *Crotalaria* are also used as remedies in parts of India (SCHOENTAL and HEAD 1955).

Java is another region of high incidence of liver cancer and here again herbal preparations are widely used by village communities. No study appears yet to have been made of the particular genera and species of plant used by Indonesian rural communities, but clearly this would be worth undertaking.

In a study of the aetiology of cancer of the upper respiratory tract in South African Bantus, KEEN and his colleagues (1955) have drawn attention to the practice of these peoples of preparing snuff from the powdered dried leaves of various plants. The snuff is taken during tribal ceremonies. The carcinogen, 3:4 benzpyrene, has been identified in the dried material, but as *Senecio* is one of the plants used by the Bantus, it seems likely that the pyrrolizidine alkaloids may again be involved.

A purely chemical consideration of the aetiology of cancer has long been realised to be too narrow and restricted an approach to be entirely acceptable. Although many carcinogens have been shown to be able to act under certain conditions as mutagens, in general there appears to be no quantitative parallelism between mutagenicity on the one hand and the capacity to initiate (or inhibit) tumour growth on the other. Even within the mammals, there are marked differences in sensitivity towards the action of carcinogens and there is little to inspire confidence in the belief that a compound found to be mutagenic in *Drosophila* is likely to be carcinogenic in a mammal. When attempting to evaluate carcinogenicity, there is the ever present difficulty of defining the borders between the processes of irritation, inflammation and tissue regeneration on the one hand, and the precancerous and cancerous stages of true malignant growth on the other. There is furthermore the disconcerting fact that under special circumstances some very inert chemical substances have been shown to be carcinogenic. The induction of tumours in rats by the subcutaneous implantation of plastic films is a striking example (ALEXANDER and HORNING 1959) which can scarcely involve active participation of the implanted material in any chemical processes occurring in the tissues. Nevertheless, since the pyrrolizidine alkaloids are known to be mutagenic in *Drosophila*, to be hepatotoxic in domestic live-stock and to be capable of inducing tumours in rats, it does seem likely that they may prove to be relatively non-species specific as regards biological activity and should therefore be given serious consideration as naturally occurring carcinogens and mutagens to man.

Summary

Nine pyrrolizidine alkaloids have been tested by the injection method for their ability to produce sex-linked recessive lethals in adult males of *Drosophila melanogaster*. At a concentration of 0.02 M, monocrotaline, lasiocarpine and heliotrine were found to be strongly mutagenic. Echinatine, echimidine, senecionine and supinine were less active, while jacobine and platyphylline were only feebly mutagenic. In four cases tested, the N-oxides were found to be less active than their parent bases. The results are discussed in relation to the possibility that some of these alkaloids may be carcinogenic in man.

Acknowledgements. My thanks are due to Mrs. E. G. CLARK and Miss M. M. GUNSON for technical assistance. The alkaloids were made available by Dr. A. T. DICK and Dr. C. C. J. CULVENOR of the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation.

Literature

- ALEXANDER, P., and E. S. HORNING: Observations on the Oppenheimer method of inducing tumours by subcutaneous implantation of plastic films. CIBA Foundation Symposium on Carcinogenesis. London: Churchill 1959.
- BERMAN, C.: Primary carcinoma of the liver. *Advanc. Cancer Res.* **5**, 55 (1958).

- BULL, L. B.: The histological evidence of liver damage from pyrrolizidine alkaloids. *Aust. vet. J.* **31**, 33 (1955).
- BULL, L. B., A. T. DICK, J. C. KEAST and G. EDGAR: An experimental investigation of the hepatotoxic and other effects on sheep of consumption of *Heliotropium europaeum* L: heliotrope poisoning in sheep. *Aust. J. agr. Res.* **7**, 281 (1956).
- BULL, L. B., A. T. DICK and J. S. MCKENZIE: The acute toxic effects of heliotrine and lasiocarpine, and their N-oxides, on the rat. *J. Path. Bact.* **75**, 17 (1958).
- CHRISTIE, G. S.: Liver damage in acute heliotrine poisoning. Biochemical changes. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* **36**, 413 (1958).
- CLARK, A. M.: Mutagenic activity of the alkaloid heliotrine in *Drosophila*. *Nature (Lond.)* **183**, 731 (1959).
- COOK, J. W., E. DUFFY and R. SCHOENTAL: Primary liver tumours in rats following feeding with alkaloids of *Senecio jacobea*. *Brit. J. Cancer* **4**, 405 (1950).
- CROWLEY, H. C., and C. C. J. CULVENOR: Alkaloid assays of *Heliotropium europaeum*. *Aust. J. appl. Sci.* **7**, 359 (1956).
- CULVENOR, C. C. J.: The alkaloids of *Heliotropeum europaeum*. *Aust. J. Chem.* **7**, 287 (1954).
- KEEN, P., N. G. DE MOOR, M. P. SHAPIRO, L. COHEN, R. L. COOPER and J. M. CAMPBELL: The aetiology of respiratory tract cancer in the South African Bantu. *Brit. J. Cancer* **9**, 528 (1955).
- MCKENZIE, J. S.: Some pharmacological properties of pyrrolizidine alkaloids and their relationship to chemical structure. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* **36**, 11 (1958).
- SCHOENTAL, R., and M. A. HEAD: Pathological changes in rats as a result of treatment with monocrotaline. *Brit. J. Cancer* **9**, 229 (1955).
- SCHOENTAL, R., and P. N. MAGEE: Chronic liver changes in rats after a single dose of lasiocarpine, a pyrrolizidine (Senecio) alkaloid. *J. Path. Bact.* **74**, 305 (1957).
- WARREN, F. L.: The pyrrolizidine alkaloids. *Prog. Chem. Organ. Nat. Prod.* **12**, 198 (1955).
- YANDERS, A.: Relative time of eclosion of *Drosophila* females heterozygous for sex-linked recessive lethals. *Amer. Naturalist* **92**, 189 (1958).

Professor A. M. CLARK, Department of Zoology, University of Tasmania,
Tasmania (Australia)

Aus dem Max Planck-Institut für Biologie, Abt. MELCHERS, Tübingen

MUTATIONSUNTERSUCHUNGEN AM TABAKMOSAIKVIRUS *IN VITRO*

I. DIE ABHÄNGIGKEIT DES ERFOLGS DER MUTAGENESE MIT HNO_2 VON DER MUTATIONSRICHTUNG

Von

K. W. MUNDY

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 1. April 1960)

Wenn man isolierte, infektiöse Ribosenukleinsäure (RNS) des Tabakmosaikvirus (TMV) mit HNO_2 *in vitro* desaminiert, erhält man inaktivierte Partikel (SCHUSTER und SCHRAMM 1958) und unter den infektiös gebliebenen eine sehr starke Zunahme an Mutanten (GIERER und MUNDY 1958; MUNDY und GIERER 1958). Das inaktivierende sowie das mutationsauslösende Ereignis ist eine oxydative Desaminierung an den Basen der RNS. Dabei kann bereits die Änderung einer einzigen der 6000 Basen der TMV-RNS wirksam sein. Dies wurde durch die Kinetik der Mutationsauslösung an der RNS des TMV-Stammes *vulgare* bewiesen und kann — entgegen anderslautender Überlegungen (BAWDEN 1959) — nicht durch Selektion erklärt werden (MUNDY und GIERER 1958; MUNDY 1959).

Dieser Befund wurde inzwischen an verschiedenen anderen Objekten bestätigt (T_2 -Bakteriophagen: VIELMETTER und WIEDER 1959; T_4 - und Φ X 174-Bakteriophagen: TESSMAN 1959; transformierendes Prinzip der Pneumokokken: LITMAN et EPHRUSSI-TAYLOR 1959; Poliovirus: BOEYÉ 1959). Ausnahmen wurden bisher nicht beschrieben.

Die Grundlage der ersten Versuche am TMV war der Test auf lokal-nekrotisierende Mutanten nach Behandlung eines nicht-nekrotisierenden, systemischen Stammes mit salpetriger Säure. In weiteren Untersuchungen wurde die Frage geprüft, ob bei zwei lokal-nekrotisierenden Stämmen der Kollektion des M.P.I. für Biologie, Abt. MELCHERS, die spontan entstanden sind, durch Desaminierungen Rückmutationen zu systemischen Stämmen erzeugt werden können. Es zeigte sich, daß der Erfolg einer Mutagenese mit HNO_2 am TMV bei dem Mutationsschritt zwischen systemischen und lokal-nekrotisierenden Varianten offenbar von der jeweils untersuchten Mutationsrichtung abhängig ist. Darüber soll im folgenden berichtet werden.

Material und Methoden

Als Ausgangsmaterial dienten die beiden nicht systemischen, auf den Blättern des Java-Tabaks lokale Nekrosen hervorrufenden TMV-Stämme *dahlemense* (MELCHERS 1942) und *necans* (MUNDY 1957b) sowie der systemische, nicht-nekrotisierende „Wild“-Stamm des TMV, *vulgare* (MELCHERS 1942). „Hin“-Mutation von systemischen zu lokal-nekrotisierenden Stämmen und „Rück“-Mutation von lokal-nekrotisierenden zu systemischen sind in Abb. 1 schematisch dargestellt. Alle Einzelheiten bezüglich Virusmaterial, Testpflanzen, Durchführung der Pflanzentests sowie Inkubation mit salpetriger Säure wurden schon früher veröffentlicht (MUNDY 1957a, MUNDY und GIERER 1958) oder befinden sich in ähnlichem Zusammenhang im Druck (MUNDY 1960b).

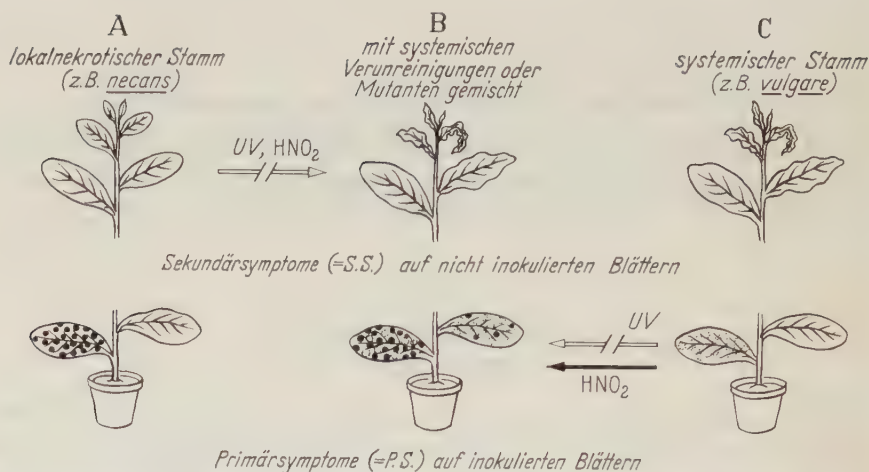


Abb. 1. „Hin“-Mutation (Pfeilspitze nach links) und „Rück“-Mutation (Pfeilspitze nach rechts) zwischen systemischen und lokal-nekrotisierenden Stämmen des Tabakmosaikvirus auf Java-Tabak (nach MUNDY 1960a). — Systemische Stämme (z.B. *vulgare*, rechte Pflanze) produzieren auf den inokulierten Blättern kaum sichtbare, hellgrüne oder gelbliche, oder unsichtbare, Infektionsherde. Von dort breitet sich das Virus in andere Pflanzenteile aus und erzeugt charakteristische Symptome an den jungen Blättern der Sproß-Spitze. — Lokal-nekrotisierende Stämme (z.B. *necans*, linke Pflanze) erzeugen auf den inokulierten Blättern deutlich sichtbare Infektionsherde in Form brauner Nekrosen, in denen das Gewebe abstirbt, und sonst keine Symptome. Alle anderen Pflanzenteile, so auch die Sproß-Spitze, bleiben gesund. — Je nach der Mutationsrichtung treten entweder Nekrosen auf den inokulierten Blättern auf, die bei den Kontrollen fehlen (Hinmutation, zweites Blatt von unten, mittlere Pflanze), oder unter den Pflanzen der Versuchsgruppe treten im Gegensatz zu den Kontrollen Pflanzen mit systemischen Symptomen auf (Rückmutation). Die bei der Rückmutation ebenfalls zu erwartenden, nicht-nekrotisierenden Infektionsherde sind zwischen den zahlreichen Nekrosen nur sehr schwer und keineswegs regelmäßig zu finden (unteres Blatt, mittlere Pflanze)

Ergebnisse

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse einiger Versuche zusammengefaßt, in denen die Rückmutation der beiden lokal-nekrotisierenden TMV-Stämme *dahlemense* und *necans* zu auf Java-Tabak systemischen Typen, entsprechend den früheren Versuchen am *vulgare*-TMV, durch Desaminierungen mittels HNO_2 erzwungen

Tabelle 1. Häufigkeit systemischer Symptome nach Inkubation lokal-nekrotisierender TMV-Stämme mit HNO_2 („Rück“-Mutation)

Virusmaterial			Infektiosität		systemische Infektionen pro inokulierte Pflanzen	Selektionsfaktor ¹	Änderung der Mutationsrate gegenüber dem Kontrollwert und dem Faktor
Stamm	Behandlung	Treffer je Partikel	Nekrosen pro Java-Blätter	relativ			
<i>necans</i>	HNO_2 -inkubiert	3	14494/120	100	1/40	100:103 = 0,97	$\frac{1 \times 40}{40 \times 4} \times 0,97 = 0,24$
	nicht-inkubierte Kontrolle	0	14994/120	103	4/40		
<i>dahlemense</i>	HNO_2 -inkubiert	3	27308/400	100	0/120	100:62 = 1,6	$\frac{0 \times 120}{120 \times 3} \times 1,6 = 0$
	nicht-inkubierte Kontrolle	0	16815/400	62	3/120		

¹ Für genauere Selektionskorrektur vgl. MUNDY, 1960b.

werden sollte. Die Lösungen wurden auf e^{-3} der Anfangskonzentration infektiöser Partikel inaktiviert. Da die Inaktivierung ein Eintrefferereignis ist, entspricht dies einer Trefferzahl von durchschnittlich 3 pro Partikel. Eine Beeinflussung der Mutationsrate zu systemischen Stämmen ist unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar.

Wie stark dagegen unter gleichen Bedingungen (Trefferzahl pro Partikel ebenfalls 3) die Mutationsrate in umgekehrter Richtung geändert werden kann, zeigt Tabelle 2. Für diese Tabelle sind Daten aus früheren Experimenten so aus-

Tabelle 2. Häufigkeit lokal-nekrotisierender Mutanten nach der Inkubation des systemischen TMV-Stammes *vulgare* mit HNO_2 („Hin“-Mutation)

Virusmaterial		Infektiosität		Mutanten (nekrotisierende Infektionsherde) pro Java- Blätter	Selektions- faktor ¹⁾	Änderung der Mutationsrate ¹ gegenüber dem Kontrollwert um den Faktor
Behandlung	Treffer/ Partikel	Nekrosen pro Xanthi- Blätter	relativ			
HNO_2 - inkubiert	3	13954/25	100	15504/45	100:73 = 1,37	$\frac{15504 \times 45}{45 \times 84} \times 1,37 = 253$
nicht inkubierte Kontrolle	0	10230/25	73	84/45		
HNO_2 - inkubiert	3	6916/25	100	4535/40	100:93 = 1,08	$\frac{4535 \times 40}{40 \times 57} \times 1,08 = 86$
nicht- inkubierte Kontrolle	0	6415/25	93	57/40		
HNO_2 - inkubiert	6	3735/20	100	2392/45	100:90 = 1,11	$\frac{2392 \times 45}{45 \times 22} \times 1,11 = 121$
nicht- inkubierte Kontrolle	0	4199/25	90	22/45		

¹ Aus noch unbekannten Gründen strebt die Mutationsrate zu nekrotisierenden Typen, wie sie an *vulgare*-RNS mit HNO_2 *in vitro* induziert werden kann, einem Sättigungswert zu (Abb. 5, MUNDY und GIERER 1958). Sie wird also mehr oder weniger unempfindlich gegen die Trefferzahl. Dieser Effekt verbunden mit schwer kontrollierbaren Aggregationen, die bei Inkubation des kompletten Virus (wie in den Versuchen dieser Tabelle) in der Nähe seines IEP auftreten, ist vermutlich die Ursache für die relativ starke Unabhängigkeit der Resultate von der Trefferzahl.

² Für genauere Selektionskorrektur vgl. MUNDY, 1960b.

gewählt, daß sie mit denen aus Tabelle 1 quantitativ vergleichbar sind. Gegenüber dem Fehlen irgendeiner Beeinflussung der Rückmutation ist hier, für die Hinmutation, eine Erhöhung der Rate gegenüber den Kontrollen gleicher Infektiosität auf das 100—200fache zu beobachten.

Diskussion

Zweifellos können einzelne Desaminierungen an der RNS des TMV-Stammes *vulgare* Mutationen verschiedenster Art herbeiführen. Da andere chemische Veränderungen außer Desaminierungen der Basen bei der Reaktion der TMV-RNS mit HNO_2 nicht nachweisbar waren (SCHUSTER und SCHRAMM 1958), beruhen

Inaktivierung und Mutation auf dem gleichen chemischen Ereignis. Die Gegenwart des TMV-Hüllproteins ist für die Mutagenese mit HNO_2 prinzipiell bedeutungslos. Es enthält keine genetische Information, sondern vermag lediglich — sofern eine ausreichende Proteinhülle vorhanden ist — die Reaktionsgeschwindigkeit des Desaminierungsprozesses an den Basen der RNS herabzusetzen. In Analogie dieser ursprünglich am *vulgare*-TMV erhaltenen und an anderen Objekten bestätigten Befunde darf man annehmen, daß auch die TMV-Stämme *dahlemense* und *necans* durch einzelne Desaminierungen inaktiviert werden können. Somit ist es möglich, „Letal“-Mutanten zu erzeugen, wie die Inaktivierung dieser beiden Stämme durch HNO_2 zeigt, aber nicht genetische Veränderungen, die als HNO_2 -induzierte Rückmutationen zu systemischen Typen gedeutet werden könnten.

Dafür gibt es folgende Erklärungsmöglichkeiten:

1. Die Spontan-Mutationen, auf denen die Entstehung von *dahlemense* und *necans* beruht, sind nicht durch Desaminierungen reversierbar (etwa weil Sequenz-Änderungen, die mehrere Nukleotide umfassen, nötig sind, oder ein Purin-Pyrimidin-Austausch, oder weil im Vergleich zur *vulgare*-RNS eine oder mehrere Basen oder Nukleotide fehlen).

2. Rückmutationen von *dahlemense* und *necans* zu systemischen Typen sind deshalb nicht möglich, weil direkte chemische Reversion der bei der *Hin*-Mutation getroffenen Base notwendig ist. Dieser Prozeß ist zu selten, um nachgewiesen werden zu können, oder gar unmöglich, wenn — zufällig — bei beiden Stämmen der Nekrotisierungscharakter durch ein an einer bestimmten Stelle des Moleküls vorhandenes Uracil fixiert ist, was nicht desaminiert werden kann.

Gleichzeitig müssen Suppressor-Mutationen ausgeschlossen sein, d.h. andere Änderungen als die direkte chemische Umkehrung des *Hin*-Mutationsprozesses bleiben in bezug auf das Verschwinden des Nekrotisierungsmerkmals wirkungslos.

Die RNS des TMV-Stammes *vulgare* z.B. besitzt möglicherweise 180 Nukleotide, bei denen für jedes einzelne eine Desaminierung der Base den Nekrotisierungscharakter herbeiführt (MUNDY und GIERER 1958). Fehlen Suppressor-Mutationen völlig, müßte die HNO_2 -induzierbare Rückmutationsrate zu systemischen Typen mindestens 180mal kleiner sein als die für die *Hin*-Mutation. Diese Änderung im umgekehrten Sinn ist bei Desaminierungen an Adenin und Guanin denkbar, jedoch kaum, wenn bei der *Hin*-Mutation Cytosin zu Uracil desaminiert wurde, was keine NH_2 -Gruppe mehr enthält. Ähnliches muß für die spontane Mutabilität gelten; tatsächlich ist die spontane Rückmutation — falls überhaupt möglich — 500mal oder noch seltener als die *Hin*-Mutation (siehe Fußnote).

Wenn auf Java-Tabak nekrotisch wirkende TMV-Stämme unter den Bedingungen der hier beschriebenen Experimente nicht rückmutieren können, erhebt sich die Frage, woher die als „spontane Rückmutanten“ registrierten, wenigen systemischen Infektionen stammen. Auffallend in diesem Zusammenhang ist, daß bei einem bestimmten, offensichtlich besonders sauberen *dahlemense*-Präparat in früheren Versuchen auf 534 Java-Pflanzen mit insgesamt 243446 Infektionsherden keine einzige systemische Infektion gefunden wurde (Versuch 4—6, MUNDY 1957a)¹. Das deutet darauf hin, daß die mit weniger sauberen Präparaten

¹ Die spontane Mutationsrate von *vulgare* zu lokal-nekrotisierenden Mutanten ist ziemlich konstant 2×10^{-3} . Gälte für die spontane Rückmutation die gleiche Rate, so müßte — obwohl für systemische Mutanten mit relativ starker Depression ihrer Manifestationswahrscheinlichkeit gerechnet werden kann (MUNDY 1957a) — ein großer Teil der 534 Pflanzen systemisch infiziert gewesen sein. Da jedoch keine einzige Pflanze systemisch erkrankte, war die spontane Rückmutation kleiner als $1:243446$ (also kleiner als 4×10^{-6}), d.h. mindestens 500mal kleiner als die Spontanrate für die *Hin*-Mutation.

auf Java-Tabak gelegentlich erhaltenen systemischen Infektionen auf präexistente Verunreinigungen zurückgeführt werden müssen. Diese Verunreinigungen entstehen während der Kultur des Virus auf systemisch reagierenden Wirtspflanzen, wie z. B. Samsun-Tabak, auf denen Java-Tabak-nekrotisierende Stämme zwecks Gewinnung ausreichender Mengen Ausgangsmaterial vor der Reindarstellung des Virusnukleoproteids zunächst vermehrt werden müssen. Daß unter solchen Bedingungen Mutanten auftreten, die sich in anderen als dem Java-Nekrotisierungsmerkmal vom Ausgangsmaterial unterscheiden, wurde von MELCHERS (1942) demonstriert.

Es bleibt abzuwarten, ob induzierte Rückmutationen lokal-nekrotisierender Stämme spontanen Ursprungs und solcher, die als Desaminierungsprodukt aus *vulgare* entstanden sind, auf andere Weise erhalten werden können, etwa durch Bestrahlung, Methylierung oder Depurinisierung, oder durch Versuche mit verschiedenen, z. B. einer „Zwischengeneration“ nicht nekrotisch reagierender, Wirtspflanzen. Bestrahlungsversuche mit UV *in vitro* (und sonst unveränderter Technik) blieben ergebnislos, und zwar für *beide* Mutationsrichtungen (MUNDY 1957a; 1960b). Versuche mit verschiedenen Wirtspflanzen zur Beurteilung der Frage, wie weit der Reaktionsmodus des Wirtsgewebes das Resultat des Mutationstests entscheidend beeinflussen und vor allem von der jeweils untersuchten Mutationsrichtung abhängig machen kann, liegen noch nicht vor. Das völlige Fehlen systemischer Infektionen, wenn Java-Tabak mit einem besonders sauberen *dahlemense*-Präparat infiziert worden war, deutet sehr auf das Fehlen von Suppressor-Mutationen, die das Nekrotisierungsmerkmal dieses Stammes für Java-Tabak unterdrücken könnten. Keinesfalls sollte bei der Diskussion der Tatsachen, daß die spontane *und* induzierte Mutationsrate in der Richtung systemisch zu nekrotisch groß ist, die Rückmutation aber bisher überhaupt nicht beobachtet wurde, folgendes außer acht gelassen werden: bei systemischen Viruskrankheiten ist die Störung des Zellstoffwechsels durch das Virus nicht so groß, daß dieser völlig zum Erliegen kommt, d. h. Virusvermehrung und die Vermehrung pflanzeigener Nukleinsäuren, Proteine u. a. m. müssen gut aufeinander abgestimmt sein. Jede Änderung in einem so komplizierten System hat eine hohe Wahrscheinlichkeit, zur völligen Entgleisung zu führen, d. h. zum Tode der Zelle. Aus diesem Status der Unordnung durch eine einfache Änderung, wenn sie die erste nicht *genau* aufhebt, wieder einen besser abgestimmten, geordneten zu machen, muß unwahrscheinlich sein. Es liegt hier also eine Situation vor, die wir ganz allgemein auch bei Mutationen im Organismus haben: im morphologischen Bereich sind Mutanten verglichen mit ihren Wildformen, die das Ergebnis langdauernder Selektion sind, häufiger „monströs“ als harmonisch; physiologisch sind Mutanten bei Organismen nur zu häufig letal, subletal oder wenigstens von herabgesetzter Vitalität. Es ist bekannt, daß auch von Seiten der Pflanze die komplizierte Situation der systemischen Erkrankung nicht selten in Richtung der „Überempfindlichkeit“ (= primär-nekrotische Reaktion) durch Mutation geändert wird. Da die Überempfindlichkeit in der Pflanzenzüchtung häufig praktische Bedeutung hat, ist diese Überlegung auch in diesem Zusammenhang von Interesse: Die Wahrscheinlichkeit, einen züchterisch wertvollen, überempfindlichen Stamm durch Mutation des Virus wieder entwertet zu sehen, ist gering; noch niemals ist ein TMV-Stamm gefunden worden, der bei Anwesenheit des aus *Nicotiana glutinosa* stammenden Gens *N* (z. B. in Xanthi-Tabak) systemisch reagierte.

Summary

When tested on Java tobacco leaves, an incubation of non-necrotic *vulgare*-TMV with HNO_2 results in a 100—200 fold increase of necrotic mutants. Under the same conditions, however, the back mutation cannot be influenced by deamination. This has been demonstrated by incubation of two *spontaneously* arisen Java necrotic strains of TMV, viz. *dahlemense* and *necans*. The reason for this dependence of the experimental results upon the direction of mutation remains unknown; but, it is assumed to be due to a more or less complete lack of suppressor mutations

Literatur

- BAWDEN, F. C.: Effect of nitrous acid on tobacco mosaic virus: mutation or selection? *Nature* (Lond.) **184**, p. B. A. 27 (1959).
- BOEYÉ, A.: Induction of a mutation in poliovirus by nitrous acid. *Virology* **9**, 691 (1959).
- GIERER, A., and K. W. MUNDY: Production of mutants of tobacco mosaic virus by chemical alteration of its ribonucleic acid *in vitro*. *Nature* (Lond.) **182**, 1457 (1958).
- LITMAN, ROSE M., et HARRIETT EPHRUSSI-TAYLOR: Inactivation et mutation des facteurs génétiques de l'acide désoxyribonucléique du pneumocoque par l'ultraviolet et par l'acide nitreux. *C. R. Sc. Akad. Scien.*, séance du 10 août 1959.
- MELCHERS, G.: Über einige Mutationen des Tabakmosaikvirus und eine „Parallelmutation“ des Tomatenmosaikvirus. *Naturwissenschaften* **30**, 48 (1942).
- MUNDY, K. W.: Zur Frage des Einflusses von Röntgen- und UV-Strahlen auf die Mutationsrate des Tabakmosaikvirus nach Bestrahlung reiner Präparate. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **88**, 115 (1957).
- MUNDY, K. W.: Die Abhängigkeit des Auftretens neuer Virusstämme von der Kulturtemperatur der Wirtspflanzen. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **88**, 407 (1957).
- MUNDY, K. W.: The effect of nitrous acid on tobacco mosaic virus: mutation, not selection. *Virology* **9**, 722 (1959).
- MUNDY, K. W.: Die Erzeugung von Virusmutationen *in vitro* an einem phytopathogenen Virus als Modell. *Bull. schweiz. Akad. med. Wiss.* 1960 (im Druck).
- MUNDY, K. W.: Mutationsuntersuchungen am Tabakmosaikvirus *in vitro*. II: Versuche zum Problem der Mutagenese durch UV-Bestrahlung reiner Viruspräparate. *Z. Vererb.-Lehre* **91**, 87 (1960).
- MUNDY, K. W., u. A. GIERER: Die Erzeugung von Mutationen des Tabakmosaikvirus durch chemische Behandlung seiner Nukleinsäure *in vitro*. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 614 (1958).
- SCHUSTER, H., u. G. SCHRÄMM: Bestimmung der biologisch wichtigen Einheit in der Ribose-nukleinsäure des TMV auf chemischem Wege. *Z. Naturforsch.* **13b**, 697 (1958).
- TESSMAN, I.: Mutagenesis in phages ØX 174 and T₄ and properties of the genetic material. *Virology* **9**, 375 (1959).
- VIELMETTER, W., u. M. WIEDER: Mutagene und inaktivierende Wirkung salpetriger Säure auf freie Partikel des Phagen T₂. *Z. Naturforsch.* **14b**, 312 (1959).

Dr. K. W. MUNDY, z. Zt. California Institute of Technology, Division of Biology
Pasadena/California

Aus dem Max Planck-Institut für Biologie, Abt. MELCHERS, Tübingen

MUTATIONSUNTERSUCHUNGEN AM TABAKMOSEKOVIRUS *IN VITRO* II. VERSUCHE ZUM PROBLEM DER MUTAGENESE DURCH UV-BESTRAHLUNG REINER VIRUSPRÄPARATE

Von

K. W. MUNDY

(Eingegangen am 7. April 1960)

Trotz vieler Untersuchungen, in denen die mutagene Wirkung des ultravioletten Lichts (UV) willkommenes Mittel zur Erhöhung von Mutationsraten war oder auch direkt Untersuchungsobjekt gewesen ist, ist bis heute wenig darüber bekannt, wie Mutationen infolge Bestrahlung mit UV (UV-Mutationen) zustandekommen. Man kennt zwar mannigfaltige radiochemische Wirkungen dieser Strahlen und unter diesen auch einige, die theoretisch für die Mutagenität des UV verantwortlich sein können, doch fehlt in allen Experimenten an zellig strukturierten Objekten die unmittelbare Beziehung zu dem genetischen Primäreignis, der Veränderung von Nukleinsäure. Die Möglichkeit einer notwendigen Beteiligung des Zellstoffwechsels am Mutationsgeschehen kann erst dann ausgeschlossen werden, wenn erfolgreiche Experimente mit isolierbaren Trägern genetischer Information, wie Viren oder die DNS des transformierenden Prinzips der Pneumokokken (TPP), vorliegen.

Die bisher an solchen Objekten erhaltenen Ergebnisse widersprechen sich. Negativen Befunden am Tabakmosaikvirus (TMV) (MUNDY 1957a) und am TPP (LITMAN et EPHRUSSI-TAYLOR 1959) stehen positive Befunde an Bakteriophagen gegenüber. TESSMAN (1956) beschreibt eine 2,5fache Erhöhung der Mutationsrate zu Plaquetyp-Mutanten bei T_1 nach einer UV-Inaktivierung auf 10^{-4} bis 10^{-8} des ursprünglichen Titors. KRIEG (1959) fand einen sehr starken Effekt nach UV-Bestrahlung von T_4r_{II} *in vitro*. Die Rückmutationsrate zu T_4r^+ stieg nach im Mittel 28 Treffern je Partikel auf fast das 100fache. Das Ergebnis ist jedoch nicht leicht zu deuten. Es ist möglich, daß multiplicity reactivation, vielleicht auch Rekombinationsphänomene, eine entscheidende experimentelle Voraussetzung für den Nachweis der Rückschläge sind.

Zur Prüfung der Frage, ob UV-Mutationen durch chemische Veränderungen an Nukleinsäuren hervorgerufen werden können, die die Integrität der Nukleotidkette nicht beeinflussen, sind phytopathogene Viren besonders geeignet. Es ist bekannt, daß jeder Bruch in der Polynukleotidkette der TMV-RNS (GIERER 1958b) oder in dem 12500 Å langen Viruspartikel des „sugar beet yellow virus“ (MUNDY 1958), das vermutlich eine dem TMV ähnliche Struktur hat (HORNE et al. 1959), zum Verlust der Infektiosität führt. Dadurch bleiben im Infektiositätstest nur solche Partikel nachweisbar, die keinen Bruch erlitten haben. Unter diesen müßten sich Mutanten befinden, wenn eine UV-Bestrahlung im obigen Sinn mutagen wirkt. Der Nachweis solcher Mutanten stößt jedoch auf Schwierigkeiten, wenn ihre Entstehungsrate sehr klein gegen die UV-induzierte

Bruchrate ist. Dies ist auf Grund der Struktur der TMV-RNS (GIERER 1958a) zu befürchten. Der Nachweis einer UV-induzierbaren Mutagenese durch Bestrahlung von TMV *in vitro* stellt damit besondere Anforderungen an die Empfindlichkeit des Mutationstests.

Zweifel an der Empfindlichkeit des in früheren Untersuchungen (MUNDY 1957a) verwendeten Mutationstest und damit Zweifel an der Berechtigung der Feststellung, daß UV-Strahlen auf TMV *in vitro* nicht mutagen wirken, kamen auf, als in Versuchen am gleichen Objekt mit salpetriger Säure eine Abhängigkeit der Mutagenese von der jeweils untersuchten Mutationsrichtung beobachtet worden war (MUNDY 1960). In den älteren Versuchen (MUNDY 1957a) wurde als Test der Schritt nekrotisch zu systemisch als Test verwendet. Mit diesem Test ließ sich jedoch eine Erhöhung der Mutationsrate nicht einmal nach Inkubation des Virus mit HNO_2 nachweisen. Daraufhin wurden neue Bestrahlungsreihen mit UV am TMV *in vitro* aufgenommen. Diese Arbeit beschreibt diese Versuche und den Vergleich der neuen Daten mit den bereits früher veröffentlichten.

Material und Methoden

Mutationstest. Grundlage für diese Mutationsversuche sind die auf Java-Tabak zu beobachtenden Unterschiede zwischen nicht-nekrotisierenden, systemischen Stämmen des TMV (z.B. *vulgare*) und lokal-nekrotisierenden, nicht systemischen Typen (z.B. *dahlemense* und *necans*). — „Hin“-Mutation: Schritt vom systemischen Typ, der keine nekrotischen Infektionsherde verursacht, zu lokal-nekrotisierenden Typen. — „Rück“-Mutation: umgekehrter Schritt von lokal-nekrotisierenden Stämmen ohne systemische Infektion zu systemischen Typen. — Die Tests wurden früher beschrieben und unverändert beibehalten (Hinmutation: MUNDY und GIERER 1958; Rückmutation: MUNDY 1957a; schematische Darstellung beider: MUNDY 1960; Fig. 1 der voranstehenden Arbeit).

Definition der „Mutationsrate“. Zahl der Symptome aberranter Typen zur Zahl aller Infektionsherde, ohne Rücksicht auf noch nötige oder bereits erfolgte Korrektur für Selektion.

Virusmaterial. Informationen über Ursprung der TMV-Stämme *vulgare* und *dahlemense*, sowie ihre Charakterisierung, bei MELCHERS (1942), für *necans* siehe MUNDY (1957b).

TMV *vulgare*. Auf Java-Tabak systemischer Normalstamm des TMV, nicht nekrotisierend. Er wurde in den meisten Fällen speziell für diese Versuche auf Java-Tabak vermehrt. Bei der Ernte wurden diejenigen Java-Blätter verworfen, die irgendwelche nekrotischen Flecke aufwiesen. Isolierung des Virus aus tiefgefrorenem Blattmaterial ähnlich der früher beschriebenen Methode (MUNDY 1957b) nach Homogenisierung in PO_4 -Puffer unter Zusatz kristallinen Na_2HPO_4 (pH 6,5—7), Hitzefällung der Wirtsproteine in 15 min bei 60° C, und anschließenden 4 Zyklen hoch- und niedertouriger Zentrifugation. Sedimente zum Schluß in m/100 PO_4 -Puffer pH 7,0 aufgenommen, Lösungen gefroren aufbewahrt bis zum Gebrauch.

TMV *dahlemense*. Auf Java-Tabak rein lokal-nekrotisierender Stamm des TMV ohne systemische Infektion der Pflanzen; vermehrt auf Samsun-Tabak und dargestellt wie bei *vulgare* beschrieben.

TMV *flavum necans* oder kurz „*necans*“. Auf Java-Tabak ebenfalls rein lokal-nekrotisierender Stamm des TMV, Mutation der *vulgare*-Mutanten *flavum*, Vermehrung auf Samsun-Tabak (dort gelbe Sekundärsymptome), Darstellung wie bei *vulgare* beschrieben.

Testpflanzen und quantitative Infektiositätstests. Als Testpflanze für allgemeine Infektiositätstests wurde die Tabakrasse *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi necroticum* (TAKAHASHI 1956) verwendet. Das Blattgewebe dieser Pflanze reagiert auf alle TMV-Stämme, unabhängig von ihrer spezifischen genetischen Konstitution, mit nekrotischen Einzelherden. Sie wurde in allen Versuchen mit *vulgare*-TMV zur Bestimmung der Infektiosität der Viruspräparate verwendet.

Als Testpflanze für nekrotisierende Mutanten sowie zur Infektiositäts-Bestimmung der lokal-nekrotisierenden Stämme *dahlemense* und *necans* wurde Java-Tabak benutzt (*Nicotiana tabacum* var. Java; MELCHERS et al. 1940).

Inokulation der Blätter erfolgte in allen Fällen durch Aufreiben der Viruslösungen mittels Mulltupfern und anschließendem kräftigem Abspülen mit Leitungswasser. Abrasives wurden nicht verwendet.

UV-Bestrahlung. UV-Quelle: Heraeus-Hanau Hg-Niederdruck-Lampe (Sterilisationsbrenner) Typ NK 25/85 (90% der Emission bei 2537 Å). Technik wie früher beschrieben (MUNDY 1957a). Konzentration der Viruslösungen im Irradiat 4×10^{-3} bis 10^{-4} g TMV/ml. Alle Lösungen in m/100 PO_4 -Puffer pH 7,5; nach der Bestrahlung entweder unverdünnt oder 1:4 mit obigem Puffer verdünnt inokuliert. Zwischen Bestrahlung und Inokulation lag normalerweise ein Zeitraum von 0,5 bis 1 Std. Alle Manipulationen wurden bei normaler Raumtemperatur durchgeführt (etwa 20° C). Die Trefferzahl t/τ ist durch Inaktivierung auf $e^{-t/\tau}$ der Anfangskonzentration infektiöser Partikel definiert (zur Technik der Auswertung s. MUNDY und GIERER 1958; τ = Bestrahlungszeit t für e^{-1} infektiös gebliebene).

Ausschluß von Selektion. Ausschluß interferenzbedingter Selektion durch Verdünnen der unbestrahlten Kontrollen auf die Infektiosität, die nach den Ergebnissen entsprechender Vorversuche als Restinfektiosität der bestrahlten Lösung erwartet werden konnte. Für die Auswertung wurden nur solche Daten verwendet, bei denen die Infektiosität der bestrahlten Präparate mit der einer Verdünnungskontrolle annähernd übereinstimmte. Diskussion der möglichen Selektionsprozesse und deren Ausschluß: MUNDY 1957a, 1959.

Signifikanz-Prüfung. Berechnung des Heterogenitäts- χ^2 nach MATHER (Gleichung 100) und Bestimmung des P über die χ^2 -Tafel von PAETAU (1942). P -Wert für die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen, gleichgroßen Überschreitung der Spontanrate.

Ergebnisse

a) Rückmutation von lokal-nekrotisierenden Stämmen zu systemischen. Wie schon früher mitgeteilt, blieben alle Versuche, Rückmutationen von lokal-nekrotisierenden zu systemischen Stämmen des TMV durch UV-Bestrahlung des Virus *in vitro* zu erzeugen, erfolglos (MUNDY 1957a). Die bisweilen aufgetretenen Differenzen zwischen den Mutationsraten des Virus in bestrahlten und unbestrahlten Präparaten konnten zwanglos auf Selektionsphänomene zurückgeführt werden. Selbst nach Inaktivierung der Viruslösungen auf 10^{-6} der Anfangskonzentration infektiöser Partikel (= e^{-14} , d. h. 14 Treffer je Viruspartikel) blieb die Mutationsrate gegenüber den Kontrollen gleicher Infektiosität unverändert bzw. Null. Diese Ergebnisse decken sich damit völlig mit denen, die an den gleichen nekrotisierenden Stämmen, *dahlemense* und *necans*, nach Behandlung mit der sonst so stark mutagen wirkenden salpetrigen Säure erhalten wurden (MUNDY 1960a).

b) Hinmutation von *vulgare* zu lokal-nekrotisierenden Mutanten. Experimente, die Hinmutation durch Bestrahlung reiner Lösungen des TMV-Stammes *vulgare* zu beeinflussen, wurden unter etwas anderen Bedingungen durchgeführt. Im Falle einer UV-induzierbaren Eintreffer-Mutagenese ist die höchste Absolut-Ausbeute an Mutanten bei einer durchschnittlichen Trefferzahl von 1 Partikel zu erwarten. Würde die UV-Bestrahlung auch nur eine Verdoppelung von 0,2% für die Spontanrate auf 0,4% herbeiführen, so könnte diese Erhöhung ohne allzu großen Materialaufwand leicht statistisch gesichert nachgewiesen werden. Gleichzeitig sind wegen der relativ geringen Inaktivierung von 1,0 auf das 0,37-fache der Anfangskonzentration infektiöser Partikel nicht so hohe Viruskonzentrationen im Irradiat notwendig und verschiedene Selektionsmöglichkeiten leichter zu überblicken. Starke Inaktivierung andererseits würde zu einem höheren Prozentsatz an Mutanten unter den infektiös gebliebenen Partikeln führen. Sie

Tabelle. Häufigkeit nekrotisierender Mutanten nach Bestrahlung des syste-

Symbol	Infektiosität in Nekrosen/Xanthi-Blätter		Mutanten-Häufigkeit in Nekrosen/Java-Blätter		Mittlere Trefferzahl	Scheinbare Erhöhung der Mutationsrate
	bestrahltes Virus	verdünntes unbestrahltes Virus	bestrahltes Virus	verdünntes unbestrahltes Virus		
	i	i_0	n	n_0	t/t_r	$q = \frac{m}{m_0} = \frac{n}{i} \cdot \frac{n_0}{i_0}$
A	819 = 8,6 95	1005 = 10,6 95	19 = 0,099 192	32 = 0,167 192	2,9	0,73
B	629 = 8,4 75	2677 = 26,8 100	10 = 0,0695 144	9 = 0,0469 192	3,0	4,72
C	2672 = 28,7 93	2122 = 23,6 90	12 = 0,075 160	9 = 0,0563 160	3,8	1,1
D	7660 = 160 48	13524 = 141 96	40 = 0,33 120	28 = 0,117 240	6,7	2,51
E	4637 = 92,7 50	16551 = 165,5 100	17 = 0,163 104	43 = 0,207 208	9,3	1,4

Logarithmisches Mittel $\bar{q} = 1,68$

setzt jedoch eine hohe Viruskonzentration im Irradiat voraus, wobei nur schwer kontrollierbare Wechselwirkungen zwischen den wenigen infektiös gebliebenen Teilchen und der sehr hohen Konzentration inaktivierter Partikel befürchtet werden müssen (MUNDY 1957a). (So entfielen z. B. in einigen früheren Versuchen auf ein infektiös gebliebenes Teilchen ca. 1 Million inaktive Partikel mehr als in den Kontrollen).

Die unter diesen Gesichtspunkten durchgeführten 5 Versuche sind in der Tabelle zusammengefaßt. Ihre Ergebnisse sind uneinheitlich, sie ähneln in dieser Beziehung sehr einigen der früheren Versuche für die umgekehrte Mutationsrichtung. Der Wert q in der Tabelle stellt den Faktor dar, um den sich die Mutationsrate des bestrahlten Virus von der der unbestrahlten Verdünnungskontrolle scheinbar unterscheidet. Er gibt an, wieviel mal größer der Prozentsatz an aberranten (= Mutanten-) Symptomen unter allen Infektionsherden im Vergleich zur Kontrolle ist. Dieser Wert sollte sich im Fall einer *in vitro* induzierten Mutagenese mehr oder weniger proportional zur Trefferzahl verhalten. Das trifft nicht zu. Die beiden statistisch gesicherten Werte für q (Experiment B und D) ergeben dadurch keinen Sinn.

Eine brauchbare Aussage ist nur durch Zusammenfassung und gemeinsame Auswertung aller 5 Versuche zu erhoffen. Man erhält dabei eine Erhöhung der Mutationsrate auf das 1,68fache des Kontrollwertes und eine Wahrscheinlichkeit von $2 \times 10^{-3}\%$ für eine gleichgroße, zufällige Überschreitung der Spontanrate.

Korrektur für interferenzbedingte Selektion

Wie die folgenden Überlegungen zeigen sollen, handelt es sich jedoch kaum um eine UV-induzierte Erhöhung der Mutationsrate, sondern sehr wahrscheinlich um eine Verschiebung von Selektions-Gleichgewichten. Wie schon früher mitgeteilt — und in Erwiderung einer von BAWDEN (1959) veröffentlichten, die ersten HNO_2 -

mischen TMV-Stammes vulgare mit UV in vitro („Hin“-Mutation)

$\frac{(i_0n - in_0)^2 \cdot (i + i_0 + n + n_0)}{(i_0 + i)(i_0 + n_0)(i + n)(n_0 + n)}$		Konzentration infektiöser Partikel in mg TMV/ml ¹		Korrekturfaktor für interferenzbedingte Selektion	Effektive Erhöhung der Mutationsrate
		bestrahltes Virus	verdünntes unbestrahltes Virus		
$\chi^2_{(1)}_{(q)}$	$P(q)$	c	c_0	$\sqrt{\frac{c}{c_0}}$	$M = \frac{n}{n_0} \sqrt{\frac{c}{c_0}}$
1,174	0,28	$6,5 \times 10^{-7}$	$9,1 \times 10^{-7}$	0,846	0,617
13,75	2×10^{-4}	$6,74 \times 10^{-6}$	$1,79 \times 10^{-5}$	0,613	2,90
0,0168	0,9	10^{-7}	$9,1 \times 10^{-7}$	0,332	0,365
15,05	10^{-4}	$0,84 \times 10^{-5}$	$1,08 \times 10^{-5}$	0,852	2,13
1,454	0,143	$3,27 \times 10^{-6}$	$8,32 \times 10^{-6}$	0,627	0,877

Logarithmisches Mittel = $M = 1,04$

Versuche betreffenden Kritik noch einmal zusammengefaßt (MUNDY 1959) — ist das „Mutationsrate“ genannte Verhältnis der Zahl Symptome aberranter Typen zur Zahl aller Infektionsherde (n/i bzw. n_0/i_0 in der Tabelle) vom Abstand der Infektionsherde auf den Blättern abhängig. Der mittlere Abstand der Infektionsherde auf den Blättern bestimmt die Häufigkeit der durch sogenannte „cross immunity“ hervorgerufenen Interferenz-Erscheinungen, derzufolge sich verschiedene Virusstämme in der Ausprägung ihrer charakteristischen Symptome sehr stark hindern können. Er ist gegeben durch die Konzentration infektiöser Partikel im Inokulum (c für die bestrahlte Probe und c_0 für die unbehandelte Verdünnungskontrolle). Setzt man r für den mittleren Abstand der Infektionsherde auf den Blättern für die bestrahlte Probe und entsprechend r_0 für die Kontrolle, so gilt

$$\frac{r}{r_0} = \sqrt{\frac{c}{c_0}}$$

(MUNDY 1960b). c_0 ist als Konzentration der Kontrolle in g TMV (oder RNS) je ml bekannt; c wird relativ dazu über die zu jedem Experiment gesondert bestimmte Konzentrations-Infektiositäts-Eichkurve ermittelt (s. MUNDY und GIERER 1958). Der Wert $\frac{c}{c_0}$ erlaubt nunmehr eine Korrektur des gefundenen Verhältnisses n/i : $n_0/i_0 = q$ (s. Tabelle) für interferenzbedingte Selektion. Ein Verdacht auf induzierte Mutagenese ist dann berechtigt, wenn

$$M = \frac{n : i}{n_0 : i_0} \sqrt{\frac{c}{c_0}} > 1.$$

¹ Die Konzentration infektiöser Partikel im Inokulum ist für c_0 das arithmetische Mittel der (bekannten) Konzentrationen der für die Auswertung herangezogenen Kontrollverdünnungen. Für c wurde sie aus der zu jedem Experiment gesondert bestimmten Konzentrations-Infektiositäts-Eichkurve ermittelt (vgl. hierzu MUNDY und GIERER 1958).

Die so ermittelten Werte für M schwanken ebenfalls sehr von Versuch zu Versuch. Auch sie ergeben im Vergleich zur Trefferzahl keinen Sinn. Das logarithmische Mittel M aus allen 5 Versuchen zeigt jedoch, daß die Mutationsrate unverändert geblieben ist: es ist 1,04.

Diskussion

Das Ergebnis der Versuche, Mutationen durch UV-Bestrahlung am TMV *in vitro* zu erzeugen, ist eindeutig negativ, und zwar für *beide* Richtungen der Mutation zwischen systemischen und lokal-nekrotisierenden Stämmen des Virus. Eine Abhängigkeit der Resultate von der Mutationsrichtung, wie sie im Fall der Mutagenese mit HNO_2 gefunden wurde (MUNDY 1960a) besteht hier nicht. Wenn also — vor allem als Folge indirekter Wirkung der UV-Strahlen, z.B. durch Erzeugung freier Radikale im Wasser — Anlässe zur Mutagenese vorhanden sein sollten, so sind sie doch so selten, daß eine etwaige geringfügige Erhöhung der Mutationsrate in der hohen Inaktivierungsrate untergeht.

Bis jetzt wurden keine entsprechenden Bestrahlungsversuche mit infektiöser TMV-RNS durchgeführt. Die Angaben von BAWDEN und KLECZKOWSKI (1959) über Photoreaktivierbarkeit UV-bestrahlter TMV-RNS und das Fehlen dieses Phänomens, wenn Ribonukleoproteid-Partikel des Virus bestrahlt wurden, läßt zumindest erkennen, daß UV-bestrahlte, freie TMV-RNS zu Reaktionen in der Lage ist, die nach Bestrahlung des kompletten Virus nicht beobachtet werden konnten. Die Serie unserer Versuche zur Mutagenität des UV auf TMV *in vitro* muß demnach noch durch entsprechende Untersuchungen an der isolierten TMV-RNS ergänzt werden.

Ohne solche Versuche mit TMV-RNS durchgeführt zu haben und ohne eine Hypothese, die den starken mutagenen Effekt des UV auf T_4 -Phagen *in vitro* befriedigend erklärt, ist es verfrüht, die am T_4 -Phagen und bis jetzt am TMV erhaltenen, konträren Resultate vergleichend zu diskutieren. Es kann lediglich festgestellt werden, daß „multiplicity reactivation“ oder Rekombinationsereignisse als mögliche entscheidende experimentelle Voraussetzungen für den Nachweis von UV-Mutationen beim TMV praktisch ausgeschlossen sind. TMV-Mutationen können jedoch sehr leicht durch Veränderung einzelner Basen ausgelöst werden, sofern die Integrität des RNS-Moleküls erhalten bleibt (GIERER und MUNDY 1958; MUNDY und GIERER 1958). UV-Bestrahlung des kompletten Virus ist zur Erzeugung solcher Mutationen offensichtlich ungeeignet. Ob das eine Folge einer im Vergleich zu mutagenen Veränderungen an den Nukleotiden zu hohen Bruchrate in der Nukleotidkette ist, oder direkt durch einen Mangel genetisch sich auswirkender, chemischer Veränderungen an den Basen erklärt werden muß, bleibt vorerst unentschieden.

Summary

Tobacco mosaic virus nucleoprotein was irradiated with UV *in vitro* and tested on Java tobacco plants for virus mutations. Both the mutation rate of systemic *vulgare*-TMV to local-necrotic mutants as well as the rate of the local-necrotic strains *dahlemense* and *necans* to systemic „wild type“ mutants remained unaffected. The results are, therefore, independent of the direction of mutation. They confirm the earlier claim that UV has no mutagenic effect on TMV *in vitro*.

Literatur

- BAWDEN, F. C.: Effect of nitrous acid on tobacco mosaic virus: mutation or selection? *Nature* (Lond). **184**, p. B. A. 27 (1959).
- BAWDEN, F. C., and A. KLECZKOWSKI: Photoreactivation of nucleic acid from tobacco mosaic virus. *Nature* (Lond.) **183**, 503 (1959).
- GIERER, A.: Größe und Struktur der Ribosenukleinsäure des Tabakmosaikvirus. *Z. Naturforsch.* **13b**, 477 (1958).
- GIERER, A.: Die Größe der biologisch aktiven Einheit der Ribosenukleinsäure des Tabakmosaikvirus. *Z. Naturforsch.* **13b**, 485 (1958).
- GIERER, A., and K. W. MUNDY: Production of mutants of tobacco mosaic virus by chemical alteration of its ribonucleic acid. *Nature* (Lond.) **182**, 1457 (1958).
- HORNE, R. W., G. E. RUSSELL and A. R. TRIM: High resolution electron microscopy of beet yellows virus filaments. *J. Mol. Biol.* **1**, 234 (1959).
- KOLLER, S.: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen. Dresden u. Leipzig: Theodor Steinkopf 1943.
- KRIEG, D. R.: Induced reversion of T₄rII mutants by ultraviolet irradiation of extracellular phage. *Virology* **9**, 215 (1959).
- LITMAN, ROSE M., et HARRIETT EPHRUSSI-TAYLOR: Inactivation et mutation des facteurs génétiques de l'acide désoxyribonucléique du pneumocoque par l'ultraviolet et par l'acide nitreux. C. R. Sc. Akad. Sci., séance du 10 août 1959.
- MATHER, K.: Statistische Analysen in der Biologie. Nach der zweiten Auflage (1946) ins Deutsche übersetzt von A. ZELLER, Wien: Springer.
- MELCHERS, G.: Über einige Mutationen des Tabakmosaikvirus und eine „Parallelmutation“ des Tomatenmosaikvirus. *Naturwissenschaften* **30**, 48 (1942).
- MELCHERS, G., G. SCHRAMM, H. TRURNIT u. H. FRIEDRICH-FREKSA: Die biologische, chemische und elektronenmikroskopische Untersuchung eines Mosaikvirus aus Tomaten. *Biol. Zbl.* **60**, 524 (1940).
- MUNDY, K. W.: Zur Frage des Einflusses von Röntgen- und UV-Strahlen auf die Mutationsrate des Tabakmosaikvirus nach Bestrahlung reiner Präparate. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **88**, 115 (1957).
- MUNDY, K. W.: Die Abhängigkeit des Auftretens neuer Virusstämme von der Kulturtemperatur der Wirtspflanzen. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **88**, 407 (1957).
- MUNDY, K. W.: Über die Korrelation zwischen Partikellänge und Infektiosität beim Vergilbungsvirus der Rüben. *Z. Naturforsch.* **13b**, 19 (1958).
- MUNDY, K. W.: The effect of nitrous acid on tobacco mosaic virus: mutation, not selection. *Virology* **9**, 722 (1959).
- MUNDY, K. W.: Mutationsuntersuchungen am Tabakmosaikvirus *in vitro*. I. Die Abhängigkeit der Mutagenese mit HNO₂ von der Mutationsrichtung. *Z. Vererb.-Lehre* **91**, 81 (1960).
- MUNDY, K. W.: Some aspects of strain interference in tobacco mosaic virus inoculated tobacco leaves. In Vorbereitung (1960).
- MUNDY, K. W., u. A. GIERER: Die Erzeugung von Mutationen des Tabakmosaikvirus durch chemische Behandlung seiner Nukleinsäure *in vitro*. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 614 (1958).
- PÁTAU, K.: Eine neue χ^2 -Tafel. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **80**, 558 (1942).
- TAKAHASHI, N. W.: Increasing the sensitivity of the local-lesion method of virus assay. *Phytopathology* **46**, 654 (1956).
- TESSMAN, E. S.: Growth and mutation of phage T₁ on ultraviolet-irradiated host cells. *Virology* **2**, 679 (1956).

Dr. K. W. MUNDY, z. Zt. California Institute of Technology, Division of Biology,
Pasadena/California

Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln

CHROMOSOMENBESTAND UND GESCHLECHT BEI HETEROPLOIDEN NACHKOMMEN VON *SPHAEROCARPUS DONNELLII* *

Von

G. KIRCHEISEN

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. April 1960)

I. Einleitung

Bei Tieren und Pflanzen, die Geschlechtschromosomen besitzen, weiß man zunächst nicht, ob die geschlechtsbestimmenden Gene ausschließlich auf den Heterosomen lokalisiert sind. Ein Vergleich des Geschlechts von Individuen verschiedener Polyploidiestufen und unterschiedlicher Kombinationen von Autosomen und Geschlechtschromosomen zeigte, daß sich die wirksamen Gene sowohl auf den Geschlechtschromosomen als auch auf den Autosomen befinden können. Derartige Untersuchungen wurden vor allem an *Drosophila* (BRIDGES 1925), *Rumex acetosa* (ONO 1935), *Melandrium dioicum* (WARMKE u. BLAKESLEE 1939) und *Melandrium album* (ONO 1940, WESTERGAARD 1940) vorgenommen. Auf eine andere Weise, nämlich durch Bestrahlungsexperimente, versuchten KNAPP (1935a, b), KNAPP und HOFFMANN (1939), LORBEER (1936a, 1938, 1941) und HEITZ (1942) bei dem getrenntgeschlechtigen Lebermoos *Sphaerocarpus Donnellii* die Lage der geschlechtsbestimmenden Gene aufzuklären. Sie fanden, daß ein Gen oder mehrere Gene, die an der Ausbildung der weiblichen Merkmale beteiligt sind, auf dem X-Chromosom liegen müssen. Die Lokalisation des Gens oder der Gene für männliches Geschlecht konnte jedoch nicht erreicht werden. Es erschien daher wünschenswert, diese Frage noch einmal anzugehen.

Der weibliche Gametophyt von *Sphaerocarpus Donnellii* Aust. besitzt 7 Autosomen und ein X-Chromosom, das Männchen 7 Autosomen und ein Y-Chromosom (ALLEN 1917 u. a.). Die Geschlechtschromosomen lassen sich voneinander und von den Autosomen unterscheiden. Das X-Chromosom ist das größte, das Y-Chromosom das kleinste des Satzes. Beide Geschlechtschromosomen sind heterochromatisch. Die normalen Tetraden keimen immer zu zwei männlichen und zwei weiblichen Gametophyten aus. Diploide Gametophyten entstehen spontan durch Mitosestörungen beim vegetativen Wachstum oder durch eine anomale Sporenbildung. Thalli mit $14 + 2 X$, $14 + 2 Y$ und $14 + X + Y$ Chromosomen wurden mehrfach beschrieben (ALLEN 1919, 1932, 1934, 1935; LORBEER 1927; KNAPP 1935a, 1936; MACKAY u. ALLEN 1936; MACKAY 1937). Gametophyten mit dem Genom des Sporophyten sind nicht monözisch wie bei manchen anderen Moosen, sondern überwiegend weiblich (ALLEN 1919) oder rein weiblich (KNAPP 1936).

* I. Teil einer Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Köln.

Kreuzt man diploide Gametophyten mit haploiden, dann kann man unter der Nachkommenschaft heteroploide Pflanzen erwarten (KNAPP 1936). Die Möglichkeit, Gametophyten mit verschiedenen Kombinationen von Autosomen und Geschlechtschromosomen in Hinsicht auf ihre Geschlechtsausprägung zu vergleichen, wird zu den im folgenden beschriebenen Versuchen ausgenutzt.

II. Material und Methoden

1. Verwendete Pflanzen

Zu den Versuchen wurde ein normaler weiblicher Klon von *Sphaerocarpus Donnellii* Aust. mit der Bezeichnung 4/2 ♀ benutzt und der normale männliche Stamm „Linie 4, 2349, 4b“, der im folgenden als 4 ♂ bezeichnet wird. Beide Gametophyten und auch die in einigen Kreuzungen verwendete Mutante 2614 ♀ stammten aus den Kulturen von Prof. Dr. E. KNAPP¹.

2. Kulturbedingungen

Die Gametophyten wurden in Petri-Schalen auf Benecke-Agar kultiviert. Die Petri-Schalen standen in einem Moosschrank bei 21° während der 12stündigen Lichtperiode und bei 18° während der Dunkelheit. Als Lichtquelle dienten Osram-Leuchtstoffröhren 40 W, HNI (etwa 3500 Lux).

3. Methode der Kreuzung

Die weiblichen Gametophyten wurden mit sterilem dest. Wasser, Leitungs- oder Regenwasser so übergossen, daß es die Thalli bedeckte. Die männlichen Pflanzen wurden vom Agar genommen und in das Wasser getaucht. Nach 6 Std wurden das Wasser und die männlichen Pflanzen wieder entfernt.

4. Methode der Sporenaussaat

Sporogone, deren Sporen zur Keimung gebracht werden sollten, wurden zur Förderung der Keimung 6 Wochen in Wasser in einen Thermostaten bei 25° ohne Beleuchtung gestellt (KNAPP 1935a, ABEL mündl. Mitteilung). Anschließend wurden die Sporenverbände auf Agar ausgelegt und bei 18° unter Tageslicht gehalten.

5. Methoden der cytologischen Untersuchung

a) *Bestimmung der Chromosomenzahlen in Gametophyten.* Fixierung: Alkohol-Eisessig 2:1; 1—2 Std nach dem Ende der Beleuchtungsperiode. Färbung: Karminessigsäure mit FeCl₃-Zusatz, zur Differenzierung 45%ige Essigsäure.

b) *Untersuchung der Meiose.* Fixierung von Sporogonen in Chloroform-Carnoy (Alkohol, Chloroform, Eisessig 6:3:1). Färbung: Karminessigsäure mit FeCl₃-Zusatz, 24 Std bei 60°. Differenzierung mit 45%iger Essigsäure. Die Sporogone wurden anschließend auf einem Objektträger in einem Tropfen gesättigter wäßriger Lösung von Phenol durch leichten Druck auf das Deckglas geöffnet. Der Zusatz von Phenol (v. STOSCH 1952) verbesserte die Präparate, da das Phenol die Fetttropfen herauslöst, die besonders in älteren Sporenmutterzellen die Beobachtung erschweren.

6. Colchicinbehandlung

Durch Einwirkung von Colchicin auf Thallusmitosen wurden diploide Gametophyten der Klone 4/2 ♀, 4 ♂ und 2614 ♀ hergestellt. Kräftig wachsende Pflanzen wurden 7 Tage lang auf dem Agar mit 1%iger Colchicininlösung betropft, bis sich über dem Thallus ein Flüssigkeitsfilm bildete. Wenn die Lösung eingetrocknet war, wurde erneut aufgetropft. Nach der Colchicinierung wurden die Thalli kurz mit Wasser abgespült und auf frischen Agar gesetzt. Von den Regeneraten, die sich an den Thallusrändern bildeten, wurden diejenigen, die durch ein größeres Zellnetz auffielen, auf ihren Polyploidiegrad untersucht.

¹ Für die Überlassung des Materials danke ich Herrn Professor Dr. E. KNAPP bestens.

III. Ergebnisse der Kreuzungen

1. Kreuzung haploider Weibchen mit haploiden Männchen

Zum Vergleich mit den Kreuzungen, an denen diploide Gametophyten beteiligt waren, wurden 12 Kreuzungen zwischen 2 normalen haploiden Pflanzen angesetzt (Stamm 4/2 ♀ × Stamm 4 ♂) (Abb. 2 und 3).

Tabelle 1. Zahl der Tetraden (T), Triaden (Tr), Dyaden (D) und Monaden (M) in Sporogonen aus der Kreuzung haploider Weibchen mit haploiden Männchen

Zahl der Sporogone	Zahl der Sporenverbände	T	Tr	D	M
34	1790	1782	1	6	1

46 Dyaden aus den in der Tabelle 1 zusammengefaßten Sporogonen und auch aus Sporenkapseln anderer Kreuzungen zwischen den beiden normalen Gametophyten wurden ausgesät. Aus 6 Dyaden entwickelten sich je zwei weibliche Keimlinge, aus 11 Dyaden je ein Weibchen

a) Zahl der Sporenverbände. In den geprüften Sporogonen fanden sich in überwiegender Zahl Tetraden. In geringem Prozentsatz traten auch Triaden, Dyaden und Monaden auf.

b) Zahl und Geschlecht der Keimlinge aus Tetraden- und Dyadensporen. Die Tetraden eines oder mehrerer Sporogone aus jeder Kreuzung gelangten zur Aussaat. Die Tabelle 2 gibt eine Zusammenstellung der Zahl der Keimlinge.

Tabelle 2. Zahl und Geschlecht der Keimlinge von Tetraden aus diploiden Sporogonen

Zahl der Tetraden	Zahl der gekeimten Tetraden	Geschlecht der Keimlinge							
		2 ♀ + 2 ♂	2 ♀ + 1 ♂	2 ♀	1 ♀ + 2 ♂	1 ♀ + 1 ♂	2 ♂	1 ♀	1 ♂
1782	1570	934	212	99	92	93	39	65	36

und ein Männchen. 16 Dyaden ergaben je eine weibliche Keimpflanze, 13 Dyaden keimten nicht. Entstanden aus einer Dyade ein männlicher und ein weiblicher Gametophyt, so besaß das Männchen 14 + 2 Y, das Weibchen 14 + 2 X Chromosomen. Waren beide Keimlinge weiblich, so hatten beide 14 + X + Y Chromosomen.

11 Monaden fanden sich in den untersuchten Sporenkapseln. Keine entwickelte eine Keimpflanze.

2. Kreuzung diploider Weibchen mit haploiden Männchen

In den Kreuzungen, die in diesem und den folgenden Abschnitten behandelt werden, wurden diploide Weibchen und Männchen, die aus Dyaden eines Sporogons der Kreuzung 4/2 ♀ × 4 ♂ stammten und diploide Gametophyten aus Colchicinversuchen verwendet

Tabelle 3. Zahl der Sporenverbände in Sporogonen der Kreuzung diploider Weibchen mit haploiden Männchen

Zahl der Sporogone	Zahl der Sporenverbände	T	Tr	D	M
47	1822	1646	—	135	41

(Abb. 4 und 5). Die Fertilität aller diploiden Weibchen war im Vergleich zu der haploider Weibchen gesenkt. Alle diploiden Männchen waren nur in sehr geringem Maße fertil.

a) Zahl der Sporenverbände. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Sporenverbände, die sich in 47 Sporenkapseln, ent-

standen aus der Kreuzung diploider Weibchen mit haploiden Männchen, befanden.

b) Geschlecht und Chromosomenzahlen der Keimlinge aus Tetraden und Dyaden. Die ausgesäten Tetraden keimten schlecht. Immerhin läßt sich bei der Betrachtung

tung der Nachkommenschaft sagen, daß Tetraden mit 4 weiblichen Keimpflanzen überwiegen.

Tabelle 4. Zahl und Geschlecht der Keimlinge von Tetraden, die der Kreuzung diploider Weibchen mit haploiden Männchen entstammen

Zahl der Tetraden	Zahl der gekeimten Tetraden	Geschlecht der Keimlinge								
		4 ♀	3 ♀ + 1 ♂	3 ♀	2 ♀ + 2 ♂	2 ♀ + 1 ♂	1 ♀ + 1 ♂	2 ♂	1 ♀	1 ♂
1646	280	22	1	30	1	1	3	56	160	6

Die Keimpflanzen sahen zum größten Teil schon früh typisch männlich oder weiblich aus. Die Archegonien und Antheridien waren normal ausgebildet. Irgendwelche Zwischenformen konnte man weder in der Gestalt des Thallus noch bei der Ausbildung der Geschlechtsorgane beobachten. Geschlechtsumschlag, den KNAPP (1936) beschrieb, trat bei den Nachkommen dieser Kreuzung nicht auf.

Man konnte annehmen, daß die Gametophyten Autosomenzahlen zwischen 7 und 14 besaßen, und daß die Summe der Chromosomen aus den 4 Keimlingen einer Tetrade gleich der doppelten Chromosomenzahl des Sporophyten (3 n) sei. Als Beispiel sei eine Tetrade mit den erwarteten Chromosomenzahlen angeführt:

- 1. 10 + X + Y = ♀
- 2. 10 + X + Y = ♀
- 3. 11 + X = ♀
- 4. 11 + X = ♀

Nicht in allen Fällen entsprachen die gefundenen Zahlen den erwarteten, oft waren sie geringer, gelegentlich auch größer, wie z.B. bei folgender Tetrade:

- 1. 13 + X = ♀
- 2. 14 + X = ♀
- 3. 14 + X + Y = ♀
- 4. 14 + X + ? = ♀

Für die Abweichungen konnte nur in wenigen Fällen eine Störung der Meiose verantwortlich sein. Bei der cytologischen Untersuchung zahlreicher Meiosepräparate wurde nämlich nur einmal beobachtet, daß in einer triploiden Sporenmutterzelle ein Bivalent nicht in die Interkinesekerne einbezogen wurde. Die aus Kreuzungen diploider Weibchen mit haploiden Männchen hervorgegangenen Gametophyten selbst mußten also ihre Chromosomenzahlen verändert haben. Dafür spricht, daß man an verschiedenen Stellen des Thallus abweichende Chromosomensätze findet. Die Veränderung erfolgt wahrscheinlich in Schritten verschiedener Größe. Es gingen dabei nur Autosomen verloren oder wurden vermehrt, die X-Chromosomen waren vollzählig vorhanden. Der Nachweis, ob die Y-Chromosomen auch erhalten bleiben ist schwierig, da das Y-Chromosom in der Mitose nicht immer zu erkennen ist. Manchmal verringern vegetative Zellen ihre Chromosomenzahlen auch in einem Schritt auf die Hälfte. Im Thallus eines Gametophyten fanden sich z.B. nahe beieinander eine tetraploide und eine diploide Metaphaseplatte. Äußerlich macht sich ein solcher Vorgang dadurch bemerkbar, daß ein vom übrigen deutlich abweichender Ast entsteht.

In Gametophyten aus Tetraden der Kreuzung $(14 + 2 X) \times (7 + Y)$ wurden folgende Chromosomenzahlen nachgewiesen:

$7 + X$	$= \text{♀}$	$7 + Y$	$= \text{♂}$
$10 + X$	$= \text{♀}$	$11 + Y$	$= \text{♂}$
$10 + X + Y$	$= \text{♀}$	$12 + Y$	$= \text{♂}$
$11 + X$	$= \text{♀}$	$14 + Y$	$= \text{♂}$
$12 + X$	$= \text{♀}$		
$12 + X + Y$	$= \text{♀}$		
$13 + X$	$= \text{♀}$		
$14 + X$	$= \text{♀}$		
$14 + X + Y$	$= \text{♀}$		

Von 135 ausgesäten *Dyaden* ergaben 10 Keimlinge. Aus 9 Dyaden entstand je ein Weibchen, aus einer Dyade keimte ein männlicher Gametophyt. Die weiblichen Pflanzen wichen in ihrem Aussehen stark vom Normalen ab. Die Geschlechtsorgane der Thalli waren verkümmert. Die Form der in geringer Zahl ausgebildeten Hüllen ließ jedoch schließen, daß es sich um weibliche Gametophyten handelte (Abb. 6). Sie waren völlig steril. Die cytologische Untersuchung zeigte, daß auch diese Pflanzen ihre Chromosomenzahlen während des Wachstums änderten. In manchen Fällen wurden die Gametophyten im Laufe der Zeit diploid. Bei einigen Dyadengametophyten fanden sich folgende Chromosomenzahlen:

$18 + 2 X$	$= \text{♀}$
$21 + 2 X$	$= \text{♀}$
$22 + 2 X$	$= \text{♀}$
$24 + 2 X$	$= \text{♀}$

Der männliche Gametophyt hatte bei der ersten Untersuchung $22 + 2 Y$, später $21 + 2 Y$ Chromosomen.

Zum Vergleich mit LORBEER (1936b) wurde die Meiose in den triploiden Sporenmutterzellen untersucht. Die Metaphase der ersten Reifeteilung zeigte das von LORBEER beschriebene Bild. In 122 Sporenmutterzellen trennte die erste Meiose ein X- und das Y-Chromosom von dem zweiten X-Chromosom. In 8 Zellen gelangten beide X-Chromosomen in einen Interkinesekern und das Y-Chromosom in den anderen. KNAPP (1936) schloß aus der Zahl der Tetraden mit 4 weiblichen oder 2 weiblichen und 2 männlichen Keimpflanzen, daß in 92% der Sporenmutterzellen die erste Reifeteilung ein X- und das Y-Chromosom von dem zweiten



Abb. 1. Metaphase einer Mitose:
 $14 + X + 2 Y$ Chromosomen.
Vergr. 800:1

X-Chromosom trennte. LORBEER fand diesen Verteilungstyp bei der Untersuchung der Metaphase der Meiosis I nur in 66% der Zellen verwirklicht. Bei eigenen Versuchen [s. KIRCHEISEN, Z. Vererb.-Lehre **91**, 106—113 (1960)] hat es sich gezeigt, daß der Ablauf der Meiose temperaturabhängig ist. Das mag auch für die Verteilung der Geschlechtschromosomen gelten. Unter den beschriebenen Kulturbedingungen stimmte allerdings die Häufigkeit der beiden Verteilungstypen bei 25° mit der bei 21° überein. Mit $\chi^2 = 0,92$ und $p = 30\text{—}50\%$ ließ sich sichern, daß ein Verhältnis von 38:2 (bei 25°) mit 122:8 (bei 21°) im Einklang steht.

c) Geschlecht und Chromosomenzahlen von Tetradenkeimlingen aus der Kreuzung eines colchicin-diploiden Weibchens mit haploiden Männchen. Weibliche diploide Gametophyten der Mutante 2614 ♀, die durch Colchicineinwirkung entstanden waren, wurden zu einigen Kreuzungen mit normalen Männchen verwandt. Die Ergebnisse stimmten mit den oben beschriebenen überein. Auffällig war jedoch

eine Tetrade, aus der sich 4 männliche Keimlinge entwickelten. Trotz des Besizes von Antheridien waren sie steril. Zwei Gametophyten hatten $14 + 2Y + X$, die beiden anderen $14 + 2Y$ Chromosomen (Abb. 1 und 7). Weder die Autosomen noch die Geschlechtschromosomen unterschieden sich äußerlich von den Chromosomen anderer Pflanzen. Es ließ sich nicht klären, wie aus einer Sporenmutterzelle eines triploiden Sporogons 4 Sporen mit den angeführten Chromosomenzahlen entstanden waren.

3. Kreuzung haploider Weibchen mit diploiden Männchen

a) Zahl der Sporenverbände. 63 Kreuzungen zwischen haploiden Weibchen (Stamm 4 2 ♀) und diploiden Männchen (aus Dyaden der Kreuzung $4/2 \text{ ♀} \times 4 \text{ ♂}$) ergaben nur 6 Sporogone.

b) Geschlecht und Chromosomenzahlen der Tetradenkeimlinge. Die Keimung war bei den Tetradensporen überraschend gut, während sie bei den Triaden und Dyaden ausblieb.

Tabelle 5. Zahl der Sporenverbände in Sporogonen der Kreuzung haploider Weibchen mit diploiden Männchen

Zahl der Sporogone	Zahl der Sporenverbände	T	Tr	D	M
6	370	366	2	2	—

Tabelle 6. Zahl und Geschlecht der Keimlinge aus Tetraden, die der Kreuzung haploider Weibchen mit diploiden Männchen entstammen

Zahl der Tetraden	Zahl der gekeimten Tetraden	Geschlecht der Keimlinge							
		2 ♂ + 2 ♂	2 ♂ + 1 ♂	2 ♂	1 ♀ + 2 ♂	1 ♀ + 1 ♂	2 ♂	1 ♀	1 ♂
366	199	155	8	2	9	8	1	8	8

Alle cytologisch untersuchten Pflanzen erwiesen sich als haploid. Die Weibchen besaßen $7 + X$, die Männchen $7 + Y$ Chromosomen.

Es gibt 2 Möglichkeiten, diese Erscheinung zu erklären: 1. Es gelangten haploide Spermatozoiden in die Archegonien. Die Chromosomensätze der Elternpflanzen wurden daraufhin noch einmal untersucht. Alle Thalli zeigten nur diploide Mitosen. Es bleibt allerdings die Möglichkeit, daß ein extrem kleines Stück des zur Kreuzung verwandten diploiden Thallus haploid war und wenige haploide Antheridien trug. 2. Die zweite Annahme setzt voraus, daß die haploide Eizelle mit diploiden Spermatozoiden befruchtet wurde; aber im Laufe der ersten Entwicklungsschritte des Sporophyten wurde die Zahl der Chromosomen reduziert.

Welche Annahme zutrifft, ließ sich nicht entscheiden, da die Zahl der erfolgreichen $n \times 2n$ -Kreuzungen immer äußerst gering war.

4. Kreuzungen zwischen diploiden Weibchen und diploiden Männchen

a) Zahl der Sporenverbände. Zu den Kreuzungen zwischen diploiden Männchen und Weibchen wurden Dyaden-Pflanzen ($D2n \text{ ♀}$ und $D2n \text{ ♂}$) und colchicin-induzierte Diploide ($C2n \text{ ♀}$ und $C2n \text{ ♂}$) verwendet. Der Erfolg schien etwas größer als bei Kreuzungen von haploiden Weibchen mit diploiden Männchen. Die Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die entstandenen Sporenverbände.

b) Geschlecht und Chromosomenzahlen der Keimlinge aus Tetraden und Dyaden. Die Keimung der Tetraden war bei den 3 angeführten Kreuzungen unterschiedlich.

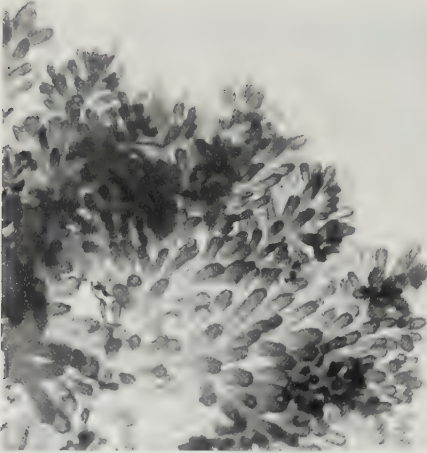
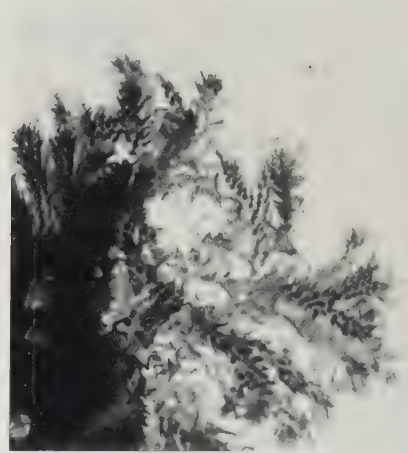


Abb. 2



Ab

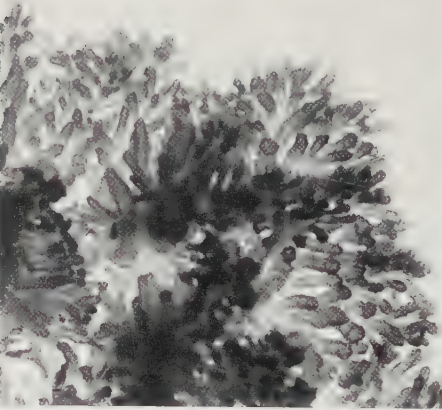


Abb. 4



Ab

Abb. 2—9 Vergr. 4:1

Abb. 2. *Sphaerocarpus Donnellii*, haploides Weibchen (Stamm 4/2 ♀)

Abb. 3. *Sphaerocarpus Donnellii*, haploides Männchen (Stamm 4 ♂)

Abb. 4. Diploides Weibchen ($14 + 2 \times$ Chromosomen), durch Colchicineinwirkung entstanden

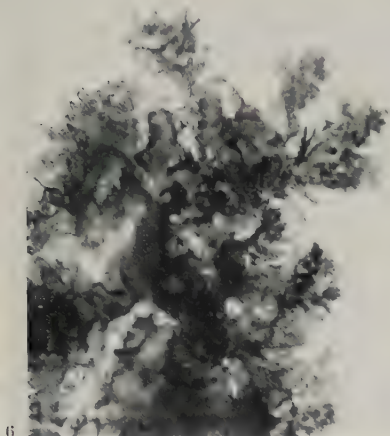
Abb. 5. Diploides Männchen ($14 + 2 \times$ Y Chromosomen), durch Colchicineinwirkung entstanden

Tabelle 7. Zahl der Sporenverbände aus Sporogonen der Kreuzung diploider Weibchen mit diploiden Männchen

Kreuzung	Zahl der Sporogone	Zahl der Sporenverbände	T	Tr	D	M
D2n ♀ × C2n ♂	12	712	692	5	9	6
C2n ♀ × D2n ♂	22	1185	1062	—	55	68
C2n ♀ × C2n ♂	20	795	674	5	85	31

Aus der Tabelle 8 kann man entnehmen, daß sich in den beiden Gruppen mit Colchicin-Diploiden als Mutter sehr wenig Gametophyten entwickelten.

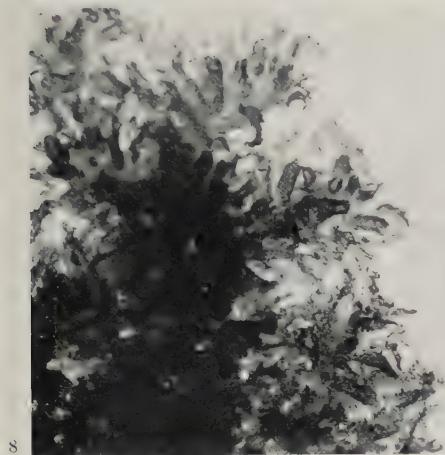
Die meisten Keimlinge gaben durch einen kräftigen Wuchs schon äußerlich zu erkennen, daß sie diploid waren. Sie sahen alle typisch männlich oder weiblich



6



Abb. 7



8



Abb. 9

- Abb. 6. Weibchen mit $21 + 2 X$ Chromosomen
Abb. 7. Männchen mit $14 + X + 2 Y$ Chromosomen
Abb. 8. Weibchen mit $28 + 2 X + 2 Y$ Chromosomen
Abb. 9. Männchen mit $26 + 2 Y$ Chromosomen

Tabelle 8. Zahl und Geschlecht der Keimlinge aus Tetraden, die der Kreuzung diploider Weibchen mit diploiden Männchen entstammen

Kreuzung	Zahl der Tetra- den	Zahl der ge- keim- ten Tetra- den	Geschlecht der Keimlinge									
			4 ♀	3 ♀	2 ♀ + 2 ♂	2 ♀ + 1 ♂	2 ♀	1 ♀ + 2 ♂	1 ♀ + 1 ♂	2 ♂	1 ♀	1 ♂
D2n ♀ × C2n ♂	692	259	4	24	3	2	64	6	9	5	126	16
C2n ♀ × D2n ♂	1062	32		1			6				24	1
C2n ♀ × C2n ♂	674	64					11				53	

aus. Ihre Antheridien und Archegonien waren normal ausgebildet. Da bei der Kreuzung haploider Weibchen mit diploiden Männchen nicht die erwarteten triploiden Sporogone gebildet wurden (s. S. 99), war es denkbar, daß bei der

Kreuzung diploider Weibchen mit diploiden Männchen triploide Sporogone entstünden. Dies ist aber nicht der Fall, denn die Chromosomengarnituren der Gametophyten aus den vollständig gekeimten Tetraden lassen eindeutig auf tetraploide Sporogone schließen. Man findet am häufigsten:

1. $14 + X + Y = \text{♀}$
2. $14 + X + Y = \text{♀}$
3. $14 + X + Y = \text{♀}$
4. $14 + X + Y = \text{♀}$

In einigen Fällen schien die Verteilung der Autosomen in der Meiose nicht ganz regelmäßig verlaufen zu sein. So erklärt sich die folgende Tetrade:

1. $13 + X + Y = \text{♀}$
2. $13 + X + Y = \text{♀}$
3. $15 + X + Y = \text{♀}$
4. $15 + X + Y = \text{♀}$

Außer diesen Weibchen fanden sich noch solche mit $13 + X$ und andere mit $14 + X$ Chromosomen.

Aus *Dyaden* dieser Kreuzungen gingen tetraploide Gametophyten hervor. Drei Dyaden ergaben je zwei weibliche Keimlinge, 10 Dyaden je einen weiblichen und eine Dyade einen männlichen Gametophyten. Die 6 weiblichen Keimlinge, die aus 3 Dyaden stammten, hatten unterschiedslos $28 + 2X + 2Y$ Chromosomen. Das einzelne Männchen besaß zur Zeit der ersten Untersuchung $26 + 2Y$ Chromosomen, später reduzierte es seinen Chromosomensatz auf $21 + 2Y$. Die Thalli der tetraploiden Pflanzen waren normalen Männchen und Weibchen ähnlicher als die triploiden Gametophyten (Abb. 8 und 9). Sie wuchsen auch im allgemeinen besser als diese. Allerdings waren sie steril; die Archegonien und Antheridien blieben unvollständig entwickelt.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Die Kreuzungen zwischen Gametophyten verschiedener Polyploidiestufe wurden in der Erwartung ausgeführt, Einsicht in den Zusammenhang von Chromosomenzahl bzw. der Zahl der Geschlechtschromosomen und Geschlecht zu gewinnen. Die folgende Zusammenstellung gibt eine Übersicht über die Befunde:

$7 + X = \text{♀}$	$10 + X + Y = \text{♀}$	$13 + 2X = \text{♀}$
$10 + X = \text{♀}$	$11 + X + Y = \text{♀}$	$14 + 2X = \text{♀}$
$11 + X = \text{♀}$	$14 + X + Y = \text{♀}$	$18 + 2X = \text{♀}$
$12 + X = \text{♀}$	$15 + X + Y = \text{♀}$	$21 + 2X = \text{♀}$
$13 + X = \text{♀}$		$22 + 2X = \text{♀}$
$14 + X = \text{♀}$	$28 + 2X + 2Y = \text{♀}$	$24 + 2X = \text{♀}$
$15 + X = \text{♀}$		
$16 + X = \text{♀}$		
$7 + Y = \text{♂}$	$14 + X + 2Y = \text{♂}$	$13 + 2Y = \text{♂}$
$10 + Y = \text{♂}$		$14 + 2Y = \text{♂}$
$11 + Y = \text{♂}$		$16 + 2Y = \text{♂}$
$14 + Y = \text{♂}$		$21 + 2Y = \text{♂}$
		$26 + 2Y = \text{♂}$

Alle weiblichen Thalli besitzen also ein oder zwei X-Chromosomen. Die männlichen Pflanzen, mit Ausnahme des Gametophyten mit $14 + X + 2Y$ Chromosomen, haben neben den Autosomen ein oder zwei Y-Chromosomen, aber kein

X-Chromosom. Aus dem Vergleich der männlichen und weiblichen Pflanzen läßt sich nur bestätigen, daß das X-Chromosom weiblichkeitsbestimmende Gene tragen muß. Y-Chromosomen, die in gleicher Zahl wie die X-Chromosomen vorhanden sind, wirken sich auf die weibliche Geschlechtsausprägung nicht aus. Ganz verschiedene Kombinationen von Autosomen mit einem oder zwei Y-Chromosomen wirken — bei Abwesenheit von X-Chromosomen — männlichkeitsbestimmend. Sowohl die Autosomen als auch das Y-Chromosom können Sitz des Männlichkeitsrealisators sein.

KNAPP (1935a, b) und KNAPP und HOFFMANN (1939) kamen auf Grund von Röntgenexperimenten, bei denen Stückverluste am X-Chromosom mit einem Umschlag vom weiblichen zum männlichen Geschlecht verbunden waren, zu dem Schluß, daß das X-Chromosom die Anlagen für das weibliche Geschlecht trage, während die männlichkeitsbestimmenden Gene auf den Autosomen lägen. LORBEER (1936a, 1938, 1941) interpretierte Versuche mit weiblichen Gametophyten, die durch Röntgenbestrahlung männliche Regenerate lieferten, anders. Er erklärte die Umwandlung durch Genmutation auf dem X-Chromosom. Nach LORBEER sollten die normalerweise wirksamen männlichen Geschlechtsrealisatoren im Y-Chromosom ihren Sitz haben.

Zwei Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen erscheinen in diesem Zusammenhang von Bedeutung. Der Gametophyt mit $14 + X + 2 Y$ Chromosomen ist männlich. Das könnte dafür sprechen, daß die männlichkeitsbestimmenden Gene auf dem Y-Chromosom lokalisiert sind, wobei zwei Dosen dieser Gene die weibliche Tendenz des X-Chromosoms nicht zur Auswirkung gelangen lassen. Allerdings wäre es auch möglich, daß ein abnormales X-Chromosom vorliegt, dessen weiblicher Realisator verändert ist. Allerdings waren die X-Chromosomen der übrigen Tetraden desselben Sporogons sicher Träger eines normalen weiblichkeitsbestimmenden Gens. Aber auch die Zusammensetzung der Autosomen dieses diploiden ($X + 2 Y$)-Männchens könnte so verändert sein, daß eine außergewöhnlich starke männliche Tendenz zustande kam. Die Existenz dieses X-haltigen Männchens legt also nahe, das Y-Chromosom als Träger der männlichen Realisatoren aufzufassen, aber sie beweist diese Annahme nicht.

Unser zweiter Befund bestand in der Erfassung zahlreicher Veränderungen der Chromosomenzahlen von heteroploiden Gametophyten, wobei die Zahl der Autosomen verändert wurde, während die Geschlechtschromosomen unverändert erhalten blieben. Es erscheint von Bedeutung, daß solche Pflanzen keinerlei Umwandlung der Geschlechtsmerkmale, geschweige denn Geschlechtsumschlag zeigten. Man kann diesen Befund bei X-haltigen Individuen so deuten, daß die Weiblichkeitstendenz des X-Chromosoms über jedes andere dominiert. Bei den Gametophyten, die ein Y-Chromosom oder deren zwei besitzen, spricht das Fehlen des Geschlechtsumschlages nicht gegen die Ansicht, die Autosomen trügen die männlichbestimmenden Gene. Man muß freilich annehmen, die Autosomen stellten in ihrer Gesamtheit die Grundlage dieser Genwirkung dar, sonst wäre der gleichbleibende Geschlechtscharakter bei veränderter Autosomenzahl kaum verständlich. Allerdings spricht die Konstanz der Geschlechtsausprägung bei den Männchen auch nicht gegen die Auffassung, die männlichen Realisatoren lägen auf den Y-Chromosomen selbst.

Summary

1. Crossings were made of diploid and haploid gametophytes of *Sph. Donnellii*. The diploid plants arose from dyad-spores or were established by colchicine-treatment.

2. Crossings of diploid females ($14 + 2X$) with haploid males ($7 + Y$) lead to a heteroploid progeny. A tetrad produced four male gametophytes, two of them with the chromosome combination as $14 + X + 2Y$, the rest with $14 + 2Y$.

3. The progeny of crosses of haploid females ($7 + X$) with diploid males ($14 + 2Y$) yielded haploid plants. From the tetrads proceeded 2 male and 2 female gametophytes.

4. Thalli with the sexual organs of both sexes never arose. Also intermediates between antheridia and archegonia could never be demonstrated. The heteroploid gametophytes showed alteration of chromosome number during growth. But no reversal of sex was observed.

5. A comparison of chromosome number and sex of the plants investigated brought the following conclusions:

a) The X-chromosome carries one or more genes responsible for expression of the female sex.

b) Genes, which determine the expression of the male phaenotype, may be located either on the autosomes or on the Y-chromosome. A decision between the two possibilities could not be found.

Die Experimente zu der vorliegenden Arbeit wurden von 1955—1959 im Botanischen Institut der Universität zu Köln durchgeführt.

Herrn Professor Dr. J. STRAUB, meinem verehrten Lehrer, danke ich für die Überlassung des Themas und die ständige Förderung meiner Arbeit.

Literatur

- ALLEN, C. E.: A chromosome difference correlated with sex differences in *Sphaerocarpos*. Science, N.s. **46**, 446—467 (1917).
- ALLEN, C. E.: The basis of sex inheritance in *Sphaerocarpos*. Proc. Amer. phil. Soc. **58**, 219—316 (1919).
- ALLEN, C. E.: Polyploidy in *Sphaerocarpos*. Proc. 6th Internat. Congr. Gen. **2**, 1—2 (1932).
- ALLEN, C. E.: A diploid female gametophyte of *Sphaerocarpos*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **20**, 147—150 (1934).
- ALLEN, C. E.: The occurrence of polyploidy in *Sphaerocarpos*. Amer. J. Bot. **22**, 635—644 (1935).
- BRIDGES, C. B.: Sex in relation to chromosomes and genes. Amer. Naturalist **59**, 127—137 (1925).
- HARTMANN, M.: Die Sexualität. Jena 1943.
- HEITZ, E.: Über mutative Intersexualität und Geschlechtsumschlag bei den Lebermoosen *Pellia Neesiana* und *Sphaerocarpus Donnellii*. Naturwissenschaften **30**, 751 (1942).
- KNAPP, E.: Untersuchungen über die Wirkung von Röntgenstrahlen an dem Lebermoos *Sphaerocarpus* mit Hilfe der Tetradenanalyse. I. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **70**, 309—349 (1935a).
- KNAPP, E.: Zur Frage der genetischen Aktivität des Heterochromatins nach Untersuchungen am X-Chromosom von *Sphaerocarpus Donnellii*. Ber. dtsch. bot. Ges. **53**, 751—760 (1935b).
- KNAPP, E.: Heteroploidie bei *Sphaerocarpos*. Ber. dtsch. bot. Ges. **54**, 346—361 (1936).
- KNAPP, E., u. I. HOFFMANN: Geschlechtsumwandlung bei *Sphaerocarpus* durch Verlust eines Stückes des X-Chromosoms. Chromosoma (Berl.) **1**, 130—146 (1939).
- LORBEER, G.: Untersuchungen über Reduktionsteilung und Geschlechtsbestimmung bei Lebermoosen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **44**, 1—109 (1927).

- LORBEER, G.: Die Umwandlung eines haploiden, genotypisch weiblichen Gametophyten von *Sphaerocarpus Donnellii* in einen männlichen mit Hilfe der Röntgenstrahlen. *Planta* (Berl.) **25**, 70—83 (1936a).
- LORBEER, G.: Distanzkonjugation der total heterochromatischen Geschlechtschromosomen von *Sphaerocarpus Donnellii*. *Ber. dtsch. bot. Ges.* **54**, 98—123 (1936b).
- LORBEER, G.: Über das Vorkommen von drei verschiedenen Geschlechtsrealisatoren bei den Lebermoosen. *Planta* (Berl.) **27**, 708—717 (1938).
- LORBEER, G.: Struktur und Inhalt der Geschlechtschromosomen. *Ber. dtsch. bot. Ges.* **59**, 369—418 (1941).
- MACKAY, E.: Variant chromosome numbers in *Sphaerocarpus*. *Bot. Gaz.* **99**, 377—386 (1937).
- MACKAY, E., and C. E. ALLEN: The offspring of a triploid sporophyte. *Proc. Amer. phil. Soc.* **76**, 781—790 (1936).
- ONO, T.: Chromosomen und Sexualität von *Rumex acetosa*. *Sci. Rep. Tohoku Imp. Univ. Biol.* **10**, 41—210 (1935). *Zit. nach HARTMANN 1943.*
- ONO, T.: Polyploidy and sex determination in *Melandrium*. II. The effect of polyploidy upon sex in *Melandrium album*. *Bot. Mag. (Tokyo)* **54**, 225—230 (1940).
- STOSCH, H. A. v.: Die Verwendung von Chloralhydrat oder Phenol zur Aufhellung und von Phenolbalsam als Einschlußmittel für Essigkarminpräparate. *Züchter* **22**, 269—272 (1952).
- WARMKE, H. E., and A. F. BLAKESLEE: Polyploids of *Melandrium*. *Science* **89**, 391—392 (1939).
- WESTERGAARD, M.: Studies on cytology and sex determination in polyploid forms of *Melandrium album*. *Dansk. bot. Ark.* **10**, 1—131 (1940).

GERDA KIRCHHEISEN, Botanisches Institut der Universität Köln,
Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 15—17

Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln

DIE BILDUNG VON DYADEN UND MONADEN
SOWIE DAS GESCHLECHT DIPLOIDER GAMETOPHYTEN
BEI *SPHAEROCARPUS DONNELLII**

Von

G. KIRCHEISEN

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. April 1960)

I. Einleitung

In den Sporogonen des Lebermooses *Sphaerocarpus Donnellii* finden sich neben den normalen Sporentetraden in einer geringen Zahl Triaden, Dyaden und Monaden. Aus den 4 Sporen einer Tetrade keimen stets 2 männliche und 2 weibliche Gametophyten. Die Kerne der Weibchen besitzen 7 Autosomen und ein X-Chromosom, die der Männchen 7 Autosomen und ein Y-Chromosom. Dyaden und deren Keimlinge beschrieben LORBEER (1927, 1934, 1936), ALLEN (1932, 1934, 1935), KNAPP (1935, 1936) und MACKAY (1937). Keimpflanzen aus Monaden wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben. Die beiden Keimlinge einer Dyade sind entweder weiblich oder der eine Gametophyt trägt weibliche, der andere männliche Geschlechtsorgane. Im ersten Fall liegt die Chromosomenzahl $14 + X + Y$, also das Genom des Sporophyten vor. Im zweiten Fall besitzen Männchen und Weibchen den doppelten Chromosomensatz des haploiden Gametophyten, also $14 + 2 Y$ bzw. $14 + 2 X$. KNAPP fand außerdem, daß aus Dyaden, die aus 2 Kreuzungen zwischen denselben Gametophyten stammten, das eine Mal hauptsächlich 2 Weibchen, das andere Mal Weibchen und Männchen keimten. Er vermutete als Ursache für dieses unterschiedliche Ergebnis veränderte Kulturbedingungen, vor allem jahreszeitliche Temperaturdifferenzen.

Dyaden und Monaden treten spontan nur selten auf. Es ist daher schwierig, ihre Entstehung cytologisch zu verfolgen. LORBEER (1934, 1936) gelang es, bei *Sphaerocarpus Donnellii* und *Sphaerocarpus terrestris* die Bildung von solchen Dyaden experimentell hervorzurufen, aus denen 2 weibliche Thalli entstanden. Bei unseren Versuchen, Sporogone von *Sphaerocarpus* bei erhöhter Temperatur reifen zu lassen, stellte sich heraus, daß der Prozentsatz an Dyaden und Monaden sehr zunahm. Es ergab sich damit die Möglichkeit, folgendes zu untersuchen:

1. In welchem Temperaturbereich ist die Bildung von Dyaden und Monaden besonders begünstigt.
2. Welche cytologisch erkennbaren Vorgänge führen in der Sporenmutterzelle zur Entstehung von Dyaden und Monaden.
3. Welcher Faktor entscheidet darüber, ob sich Dyaden entwickeln, aus denen 2 weibliche Keimlinge hervorgehen oder solche, aus denen 2 verschiedengeschlechtige Gametophyten keimen.

* 2. Teil einer Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Köln.

II. Material und Methoden

1. Verwendete Pflanzen

Zu den Versuchen wurde ein normaler weiblicher Klon von *Sphaerocarpus Donnellii* Aust. mit der Bezeichnung 4/2 ♀ benutzt und der normale männliche Stamm „Linie 4, 2349, 4b“ (im folgenden mit 4 ♂ bezeichnet). Beide Gametophyten stammten aus den Kulturen von Prof. Dr. E. KNAPP. Der diploide weibliche Gametophyt, der in einigen Kreuzungen verwendet wurde, hatte sich aus einer Dyadenspore der Kreuzung 4/2 ♀ × 4 ♂ entwickelt.

2. Kulturbedingungen

Die Gametophyten wuchsen auf Benecke-Agar in Petri-Schalen. Die Petri-Schalen standen in einem Moosschrank während der 12stündigen Lichtperiode bei 21° und während der Dunkelheit bei 18°. Als Lichtquelle dienten Osram-Leuchtstoffröhren, 40 W, HNI (etwa 3500 Lux).

Die weiblichen Pflanzen wurden 10 Tage nach der Kreuzung unter den beschriebenen Normalbedingungen gehalten. Anschließend wurden sie den Versuchsbedingungen ausgesetzt oder zur Kontrolle weiter im Moosschrank gezogen. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Versuchsbedingungen.

Tabelle 1. Übersicht über die Kulturbedingungen unter denen Sporogone zur Reife gelangten

Ort	Temperatur (° C) bei		Licht-Dunkel- Wechsel (h)		Art der Beleuchtung
	Licht	Dunkel- heit	Licht	Dunkel- heit	
Thermostat	25	23	14	10	Osram-Glühlbirne, 200 W, etwa 7000 Lux
Thermostat	28	26	14	10	Osram-Glühlbirne, 200 W, etwa 7000 Lux
Thermostat	18	16	14	10	Osram-Glühlbirne, 200 W, etwa 7000 Lux
Kulturraum	18	18	diffuses Tageslicht (März-April)		

Zur Zusammensetzung des Kulturmediums und zur Methode der Kreuzung, der Sporen-aussaat und der cytologischen Untersuchung der Meiose vgl. Z. Vererb.-Lehre **91**, 94—105 (1960).

III. Ergebnisse der Untersuchungen

1. Einfluß der Temperatur auf die Zahl und Art der Sporenverbände

Die Abb. 1 gibt eine Übersicht, in welchen Prozentsätzen Tetraden, Triaden, Dyaden und Monaden unter den verschiedenen Kulturbedingungen in den Sporogonen gefunden wurden.

Die Sporophyten bildeten im Moosschrank bei 21°, im Thermostaten und im Kulturraum bei 18° sehr wenig Dyaden und kaum Triaden und Monaden. Entwickelten sich die Sporogone jedoch bei 25°, dann traten in einem größeren Prozentsatz Dyaden (8,5%) und vor allem Monaden (18,0%) auf. Der Anteil der Monaden stieg bei 28° auf 28,9% an. Die durchschnittliche Zahl der Sporenverbände in den Sporenkapseln zeigte ebenfalls Unterschiede, die aber nicht allein von der Temperatur abhängig schienen.

Die Verminderung der Zahl der Sporenverbände bei höherer Temperatur ist nicht darauf zurückzuführen, daß unter den wahrscheinlich ungünstigen Bedingungen ein Teil der Sporen-mutterzellen sich nicht zu Sporen entwickelte. Die cytologische Untersuchung zeigte, daß in den Sporenkapseln von Anfang an weniger Sporenmutterzellen vorhanden waren.

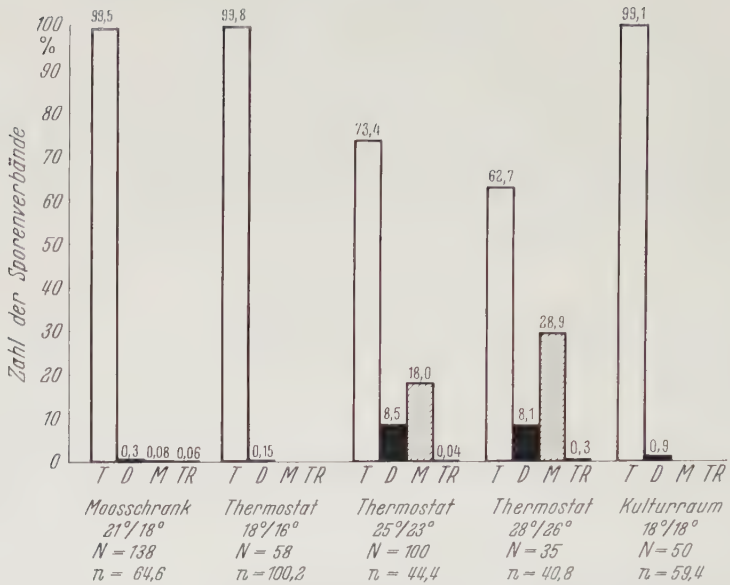


Abb. 1. Verteilung der Sporenverbände in diploiden Sporogonen unter verschiedenen Kulturbedingungen. T Tetraden; D Dyaden; M Monaden; TR Triaden; N Zahl der untersuchten Sporogone; n mittlere Zahl der Sporenverbände in den Sporogonen

2. Cytologische Untersuchung der Sporenbildung bei 25°

Dyaden und Monaden müssen durch Unregelmäßigkeiten der Meiose oder der Zellteilungen der Sporenmutterzellen entstehen. Um diese Abweichungen vom normalen Ablauf zu finden, wurden die Sporenmutterzellen vom Beginn der Meiose bis zum Abschluß der Tetradenbildung cytologisch beobachtet. Die

Sporogone reiften im Thermostaten bei 25°. Zum Vergleich wurden auch Sporogone untersucht, die sich bei 21° entwickelt hatten.

Es stellte sich heraus, daß sich weder alle Sporogone einer Kreuzung noch alle Sporenmutterzellen einer Sporenkapsel im gleichen Zustand der Tetradenbildung befanden. Diese Erscheinung wurde nicht von der erhöhten Temperatur hervorgerufen, sie fand sich nämlich sowohl bei 25° als auch bei 21°. Am 20. Tag nach der Kreuzung zeigten die Sporenmutterzellen eines Teils der Sporogone frühe bis mittlere Prophasestadien der Meiosis I, während in anderen Sporogonen die Zellen noch Ruhekerne aufwiesen. Am



Abb. 2. Pachytän (25°). Die Bivalente zeigen an einzelnen Stellen, daß sie aus zwei Einheiten zusammengesetzt sind (s. Pfeil). Das X-Chromosom ist dem Nucleolus angelagert. Vergr. 1600:1

21. Tag lief in den meisten Sporogonen die Meiose ab. Innerhalb eines Sporogons konnte man alle Meiosestadien finden, von der Diakinese bis zu vierkernigen Zellen. Am folgenden Tag war die Reifeteilung in den meisten Sporenkapseln beendet. Zu diesem Zeitpunkt ging im allgemeinen auch die Bildung der Trennwände innerhalb der Zellen vor sich.

Der Ablauf der Meiose von *Sphaerocarpus Donnellii* wurde von LORBEER (1927, 1934) und REITBERGER und BUCHNER (1958) beschrieben. Die eigenen Beobachtungen an der Meiose bei 21° stimmten mit ihren Ergebnissen überein.



Abb. 3a u. b. Diakinese (25°). Die Autosomen bilden 7 Bivalente. Das X-Chromosom liegt in einer anderen Ebene. Vergr. 450:1

Bei 25° zeigte die Prophase in den Sporenmutterzellen keine Abweichungen vom normalen Verlauf. Die Pachytänchromosomen zeigten an einzelnen Stellen deutlich, daß sie aus 2 Einheiten bestanden (Abb. 2). Das heterochromatische X-Chromosom war dem Nucleolus angelagert. Das Y-Chromosom war nur selten und dann immer in einiger Entfernung vom X-Chromosom zu erkennen. In der Diakinese fanden sich stets 7 Bivalente (Abb. 3a und b). Man konnte an ihnen nur wenig Einzelheiten erkennen. Manchmal sah man einen Längsspalt zwischen den schwach gefärbten Partnern. X- und Y-Chromosom lagen, weit stärker gefärbt, getrennt zwischen den Autosomen.

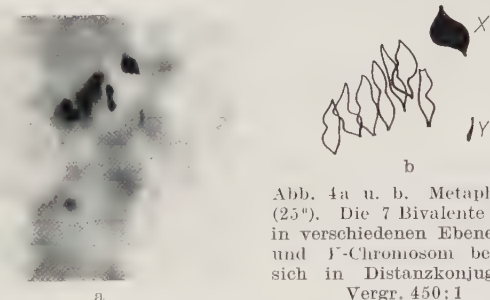


Abb. 4a u. b. Metaphase I (25°). Die 7 Bivalente liegen in verschiedenen Ebenen. X- und Y-Chromosom befinden sich in Distanzkonjugation. Vergr. 450:1

Die Metaphase I (Abb. 4a und b) zeigte bei 25° das gleiche Bild wie bei 21°. Die Autosomen bildeten 7 Bivalente. X- und Y-Chromosomen lagen fast immer abseits und stets voneinander getrennt. Sie gingen in der Anaphasebewegung den Autosomen voraus. Es wurden über 150 Metaphasen (25°) untersucht. In allen Fällen, in denen man X- und Y-Chromosomen deutlich sehen konnte, wanderten sie zu den entgegengesetzten Polen. Die folgende Anaphase führte 7 Autosomen und das X-Chromosom zum einen, 7 Autosomen und das Y-Chromosom zum anderen Pol.

Bei 25° lief in den Sporenmutterzellen, die später Tetraden bildeten, die Meiose II in gleicher Weise ab wie unter Normalbedingungen. Die Interkinesekerne gingen bald in Prophasekerne über. Die vorher gleichmäßig gekörnte Struktur des Kernraumes zeigte verdichtete, schwach färbbare Chromosomen. Das X-Chromosom des einen Kerns war meist schon gespalten und die beiden Hälften hingen höchstens noch am Centromer zusammen. Die Prophasechromosomen ordneten sich zur Metaphaseplatte der zweiten Reifeteilung. Die beiden Anaphasen liefen synchron ab, wobei die Spindeln keine Regelmäßigkeit der Lage in der Zelle zeigten. Bald darauf bildeten sich 4 Kerne.

Diesen normalen Gang der Meiose durchliefen bei 25° jedoch nur die Sporenmutterzellen, die zu Tetraden wurden. Bei den anderen Zellen blieben die beiden

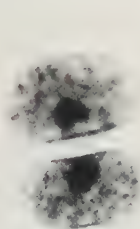


Abb. 5

Abb. 5. Dyade. Jede der beiden Zellen enthält einen Kern. Die Sporenwand ist noch dünn und ungefärbt und daher im Präparat nicht sichtbar

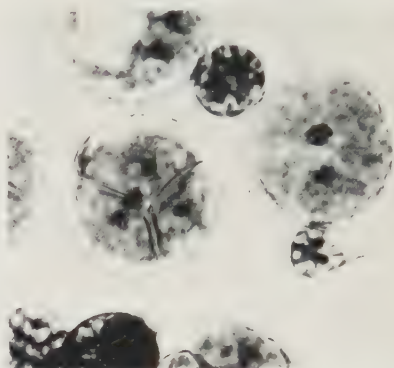


Abb. 6

Abb. 6. Tetrade und Monade. Die Monade enthält zwei Kerne

Kerne nach der ersten Meiose erhalten. Die körnige Struktur der Interkinesekerne wich dem typischen Aussehen von Ruhekernen. Die Untersuchung dieser Kerne wurde im Laufe der Entwicklung immer schwieriger, da die dicker werdende Sporenwand das gleichmäßige Eindringen des Fixierungs- und Färbemittels verhinderte. Trotzdem ließ sich feststellen, daß die Chromosomen noch keine Aufspaltung in die Chromatiden zeigten. Selbst eine endgültige Trennung der beiden Spalthälften des X-Chromosoms war nicht zu erkennen. Die beiden Kerne wanderten der Mitte der Zelle zu. Schnürte sich die Zelle während dieser Zeit ein und bildete eine Querwand, so entstand eine Dyade (Abb. 5). Bis zur nächsten Kernteilung mußte die Ausbildung der Chromatiden stattgefunden haben, denn die keimenden Gametophyten waren diploid. Die männlichen Pflanzen zeigten, wie zu erwarten, $14 + 2 Y$ -, die weiblichen $14 + 2 X$ -Chromosomen.

Wurde keine Querwand ausgebildet, dann blieben die Kerne etwas voneinander entfernt in der Mitte der Zelle liegen. Um die kugelige Zelle bildete sich die Sporenwand. Auf diese Weise entstand eine Monade. Sie enthält also 2 Kerne (Abb. 6).

Auch in triploiden Sporogonen, die aus der Kreuzung diploider Weibchen mit haploiden Männchen stammten, ließ sich der Prozentsatz an Dyaden und Monaden durch Anwendung einer höheren Temperatur steigern.

Die Wahrscheinlichkeit einer Störung der Meiose durch eine unregelmäßige Verteilung der Chromosomen ist in triploiden Sporenmutterzellen größer als in diploiden (vgl. 21°/18°-Versuch). Die cytologische Untersuchung zeigte, daß auch bei den Triploiden die Dyadenbildung

bei 25° auf dem Ausbleiben der zweiten Reifeteilung beruhte. Bis zum Ende der Anaphase I verlief die Meiose völlig normal. Die Auszählung von Metaphasen ergab, daß die erhöhte Temperatur keinen Einfluß auf die Verteilung der Geschlechtschromosomen hatte. Wenn beide Interkineskerne durch eine Zellwand getrennt wurden, entstand eine Dyade, sonst eine zweikernige Monade.

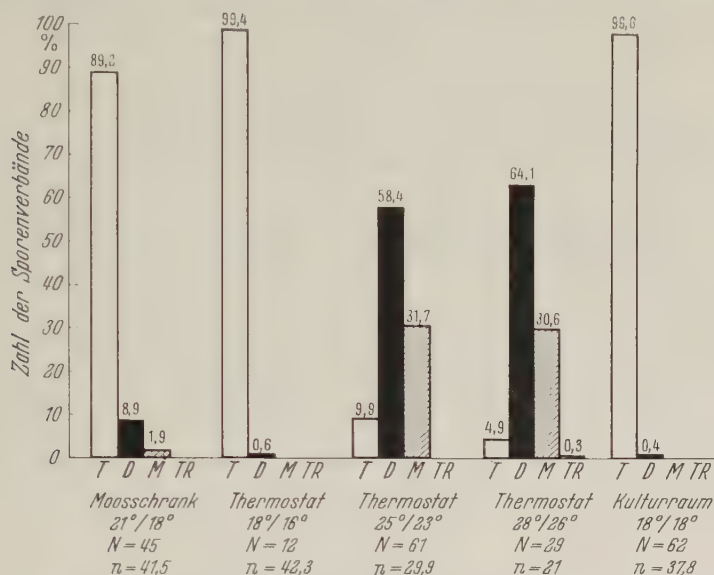


Abb. 7. Verteilung der Sporenverbände in triploiden Sporogonen unter verschiedenen Kulturbedingungen. Zeichengebung wie in Abb. 1

3. Geschlecht der Keimlinge aus Dyaden und Monaden

Aus *Dyaden*, die sich bei 21° im Mooschrank entwickeln, keimen 2 Weibchen. Bei unvollständiger Keimung wächst ein Weibchen auf. Aus *Dyaden*, die bei 25° oder 28° gebildet wurden, entstanden stets ein männlicher und ein weiblicher Gametophyt. Wenn hierbei nur eine Spore einen Keimling hervorbrachte, war er entweder weiblich oder männlich.

Die wenigen *Monaden*, die sich bei einer Temperatur von 21° in den Sporogonen fanden, keimten nicht. Die *Monaden*, die unter erhöhter Temperatur entstanden, bildeten reichlich Keimpflanzen. Bei der Keimung der *Monaden* riß an einer Stelle die Sporen-

Tabelle 2. Zahl der ausgesäten *Dyaden* sowie Zahl und Geschlecht der Keimlinge

Kulturbedingung	Zahl der Dyaden	Zahl der gekeimten Dyaden	Geschlecht der Keimlinge			
			1 ♀ + 1 ♂	1 ♀ + 1 ♀	1 ♀	1 ♂
21°/18°	28	22		11	11	
25°/23°	88	52	24		20	8
28°/26°	134	95	47		36	12

Tabelle 3. Zahl der ausgesäten *Monaden* sowie Zahl und Geschlecht der Keimlinge

Zahl der Monaden	Zahl der gekeimten Monaden	Geschlecht der Keimlinge			
		1 ♀ + 1 ♂	1 ♀ + 1 ♀	1 ♀	1 ♂
196	125	44		43	38

wand auf und es erschien ein Keimschlauch. Nachdem er ein Stück normal gewachsen war, gabelte er sich, ohne daß eine Zellwand angelegt wurde. An den

Enden der beiden Keimschläuche entwickelten sich zwei Pflanzen, von denen die eine später weibliche, die andere männliche Geschlechtsorgane ausbildete. Selten gabelte sich der Keimschlauch mehrere Male, so daß 3 oder sogar 4 Schläuche von einer Spore ausgingen. Es wuchsen aber nie mehr als 2 Keimpflanzen auf. Ein Teil der Monaden bildete einen ungegabelten Keimschlauch. Es entstand daraus ein männlicher oder ein weiblicher Gametophyt.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Die Ergebnisse sprechen dafür, daß die vermehrte Bildung von Dyaden und Monaden eine Folge der Temperaturerhöhung ist. Die Beleuchtungsstärke und die spektrale Zusammensetzung des Lichtes haben keinen entscheidenden Einfluß auf diesen Entwicklungsvorgang, denn die Versuche im Thermostaten bei 18° und 25° unterschieden sich weder in der Beleuchtungsintensität noch in der Qualität des Lichtes.

Aus den cytologischen Untersuchungen geht hervor, daß Dyaden und Monaden bei einer Temperatur von 25° dadurch entstehen, daß nach einer normalen Meiosis I die zweite Teilung ausfällt. Den gleichen Vorgang der Dyadenbildung konnte F. v. WETTSTEIN (1924) bei *Funaria hygrometrica* dadurch erreichen, daß er nach der ersten Meiose Chloralhydrat oder Kaliumnitrat auf die Sporogone einwirken ließ. Die zweite Teilung unterblieb daraufhin und es entstanden diploide Gametophyten. SAKAMURA und STOW (1927) fanden bei *Gagea lutea* unter erhöhter Temperatur Pollendyaden, die durch das Ausbleiben der zweiten Meiose entstanden waren. LEVAN (1935) untersuchte bei *Allium Schoenoprasum* cytologisch die Vorgänge, die zur Bildung von Pollendyaden führten. Die Beschreibung stimmt mit dem Ablauf bei *Sphaerocarpus* überein. LEVAN fand darüber hinaus in der Prophase der Kernteilung im Pollenkorn die Chromosomen in doppelter Anzahl paarweise geordnet. Das deutet daraufhin, daß sich die Chromatiden frühestens während des Ruhezustandes der Kerne nach der Meiosis I, vielleicht auch erst zu Beginn der folgenden Prophase getrennt hatten.

LORBEER (1934, 1936) gelang es, bei *Sphaerocarpus Donnellii* und *Sphaerocarpus terrestris* die Paarung der Chromosomen zu Beginn der Meiose zu verhindern. (Auf welche Weise er dies erreichte, ist aus den beiden kurzen Mitteilungen nicht zu ersehen.) Es lagen also $14 + X + Y$ Chromosomen in der Zelle. Eine Mitose folgte und trennte die Chromatiden. Es entstanden 2 Sporen mit der Chromosomenzahl des Sporophyten, also 2 weibliche Gametophyten. TATUNO (1935) beschrieb einen gleichen Vorgang für *Calobryum rotundifolium*. Dyadenbildung durch Ausfall der Paarung scheint demnach bei Moosen öfter vorzukommen. Bei den eigenen Versuchen fanden sich bei 21° ebenfalls Dyaden mit zwei weiblichen Keimlingen ($14 + X + Y$). Sie müssen also als Folge einer Apomeiose entstanden sein. Es ist erstaunlich, daß sich Dyaden bei *Sphaerocarpus* auf zwei so verschiedene Weisen entwickeln können. Dyaden, die zu Gametophyten verschiedenen Geschlechts auswachsen, fanden wir bei 21° nie. Im Gegensatz dazu traten bei 25° nur solche Dyaden auf, deren Entstehung auf dem Ausfall der Meiosis II beruht. Die Art der Dyadenbildung hängt also sehr klar von der Temperatur ab. Die Temperaturdifferenz, die unter den beschriebenen Kulturbedingungen eine unterschiedliche Entstehung zur Folge hat, beträgt etwa 4°. Daß die Temperatur den Ausschlag gibt, wird durch die Befunde KNAPPS (1936)

gestützt. Er fand, daß im Winter gereifte Dyaden 2 weibliche Keimlinge gaben, aus im Sommer entstandenen Dyaden keimten männliche und weibliche Gametophyten. Obwohl die Kulturbedingungen sicher von den unsrigen abwichen, dürfte doch gemeinsam sein, daß sich bei niedriger Temperatur nur Weibchen, bei höherer verschiedengeschlechtige Gametophyten einstellen.

Summary

1. A raise of temperature from 21° C to 25° C or 28° C, respectively, during the development of the sporophytes of *Sphaerocarpus Donnellii* increases the percentage of dyads and monads from 0.4% and 0.1% to 8.5% and 18.0% or 8.1% and 28.9%, respectively.

2. Dyads and monads result due to the lack of meiosis II. A dyad arises, if the two nuclei produced by meiosis I are separated by a cell wall. If no wall formation takes place, the result will be a monad with two nuclei.

3. The temperature has an influence on the combination of sex chromosomes within the nuclei of dyads. The germination of dyads built under 21° C produces two diploid female (XY) gametophytes. Dyads, however, which are formed under 25° C or 28° C, always produce one diploid female (XX) and one diploid male (YY) gametophyte.

4. Monads built under 25° C or 28° C germinate with a germ-tube, which shortly later branches off in a diploid female (XX) and a diploid male (YY) thallus.

Literatur

- ALLEN, C. E.: Polyploidy in *Sphaerocarpus*. Proc. 6th Internat. Congr. Gen. **2**, 1—2 (1932).
 ALLEN, C. E.: A diploid female gametophyte of *Sphaerocarpus*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **20**, 147—150 (1934).
 ALLEN, C. E.: The occurrence of polyploidy in *Sphaerocarpus*. Amer. J. Bot. **22**, 635—644 (1935).
 KNAPP, E.: Untersuchungen über die Wirkung von Röntgenstrahlen an dem Lebermoos *Sphaerocarpus* mit Hilfe der Tetradenanalyse. I. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **70**, 309—349 (1935).
 KNAPP, E.: Heteroploidie bei *Sphaerocarpus*. Ber. dtsch. bot. Ges. **54**, 346—361 (1936).
 LEVAN, A.: Zytologische Studien an *Allium Schoenoprasum*. Hereditas (Lund.) **22**, 1—126 (1935).
 LORBEER, G.: Untersuchungen über Reduktionsteilung und Geschlechtsbestimmung bei Lebermoosen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **44**, 1—109 (1927).
 LORBEER, G.: Die Zytologie der Lebermoose mit besonderer Berücksichtigung allgemeiner Chromosomenfragen. Jb. wiss. Bot. **80**, 567—818 (1934).
 LORBEER, G.: In: Bericht über die 50. Generalverslg. Ber. dtsch. bot. Ges. **54**, (10)—(11) (1936).
 MACKAY, E.: Variant chromosome numbers in *Sphaerocarpus*. Bot. Gaz. **99**, 377—386 (1937).
 REITBERGER, A., u. E. BUCHNER: Zur Karyologie der Meiose des Lebermooses *Sphaerocarpus Donnellii*. Chromosoma (Berl.) **9**, 258—268 (1958).
 SAKAMURA, T., u. J. STOW: Über die experimentell veranlaßte Entstehung von keimfähigen Pollenkörnern mit abweichenden Chromosomenzahlen. Jap. J. Bot. **3**, 111—137 (1926).
 TATUNO, S.: Ein Beispiel der hyperhaploiden Pflanzen und die Dyadenbildung bei *Calobryum rotundifolium*. Bot. Mag. (Tokyo) **49**, 829—898 (1935).
 WETTSTEIN, F. v.: Morphologie und Physiologie des Formwechsels der Moose auf genetischer Grundlage. I. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **33**, 1—236 (1924).

GERDA KIRCHSEIN, Botanisches Institut der Universität Köln, Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 15—17

Vom Medical Research Council, Group for Experimental Research in Inherited Diseases
(Direktor: Prof. H. GRÜNEBERG, F. R. S., University College London)

UNTERSUCHUNGEN
ZUR GENETIK UND PATHOLOGIE DER ENTWICKLUNG VON
8 LABYRINTHMUTANTEN (*DEAF-WALTZER-SHAKER-MUTANTEN*)
DER MAUS (*MUS MUSCULUS*)* **

Von

WALTER KOCHER

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 17. März 1960)

Einleitung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit allen bis jetzt bekannten Vertretern einer einheitlichen Gruppe von Mutanten der Maus mit Labyrinth-Anomalien: *deaf* („*df*“), *deafness* (*dn*), *shaker-1* (*sh-1*), *shaker-2* (*sh-2*), *pirouette* (*pi*), *jerker* (*je*), *waltzer* (*v*) und *Varitint-waddler* (*Va*). In homozygotem (bzw. bei *Va* in hetero- und homozygotem) Zustand bewirken alle diese Gene regressive degenerative Veränderungen der Stria vascularis, der Neuroepithelien und des Spiralganglions, ohne daß die Morphologie des Labyrinths (der Labyrinthkapsel) und das Volumen der Endo- und Perilymphräume betroffen wird. (Für weiteren Überblick sei auf die zusammenfassenden Darstellungen von GRÜNEBERG [1952 und 1956a und b] verwiesen).

Die genannten Veränderungen setzen bei allen diesen Mutanten (mit relativ geringen Unterschieden) im gleichen Entwicklungsstadium, kurz nach der Geburt, ein. Verhaltensmäßig zerfällt die Gruppe in Vertreter der *waltzer-shaker*-Gruppe (*sh-1*, *sh-2*, *pi*, *je*, *v*, *Va*) und die beiden Mutanten für frühe unkomplizierte Taubheit „*df*“ und *dn*, d. h. sie zerfällt in eine Gruppe von Labyrinthmutanten, die schon auf Grund ihres Verhaltens (Laufen und Drehen in Kreisen und Hochwerfen bzw. Schütteln des Kopfes) als labyrinthär gestört erkannt werden kann (*waltzer-shaker*-Gruppe) und eine Gruppe, deren labyrinthäre Störungen erst mit Hilfe von Hörtesten aufgedeckt werden können (*deaf*-Gruppe).

Die Degeneration der Neuroepithelien beschränkt sich bei „*df*“ auf das Cortische Organ (DEOL 1956b), bei *dn* kann außerdem noch die Macula des Sacculus betroffen sein (DEOL and KOCHER 1958). Bei den Vertretern der *waltzer-shaker*-Gruppe ist immer die ganze Pars inferior des Labyrinths (Cochlea und Sacculus)

* Herrn Prof. Dr. A. KÜHN zum 75. Geburtstag.

** Die vorliegende Arbeit verdankt ihre Konzeption im wesentlichen den Anregungen von Herrn Prof. H. GRÜNEBERG, F.R.S., dem ich für mannigfache Hilfe herzlich danke. Ein Teil der Arbeit wurde mit Mitteln der Rockefeller-Stiftung durchgeführt. Herrn Dr. M. S. DEOL bin ich für die Benützung seiner Präparate zu Dank verpflichtet. Herrn Dr. C. A. B. SMITH danke ich für seine Hilfe in statistischen Fragen, Ertl. H. SCHULZE für die photographische Arbeit und Frau B. VOHDIN für das Schreiben des Manuskripts. Herrn Prof. Dr. G. TÖNDURY möchte ich für die Möglichkeit, das Manuskript im Anatomischen Institut der Universität Zürich fertigzustellen, bestens danken.

betroffen, dazu kommen bei einzelnen Mutanten noch Veränderungen in der Pars superior (Macula utriculi, Cristae ampullares) (DEOL 1956a).

Jede dieser Mutanten ist genetisch hinreichend untersucht. Die Zugehörigkeit zu Koppelungsgruppen ist bekannt für *sh-1* (I), *sh-2* (VII), *pi* (III), *v* (X), *je* (XII) und *Va* (XVI) (s. GRÜNEBERG 1956b und GREEN and DICKIE 1959). Ferner wurde eine Kombinanzwirkung¹ zweier *waltzer-shaker*-Gene in der Doppelheterozygoten $+/sh-1; +/v$ beschrieben (LORD and GATES 1929). Es blieb abzuklären, ob zwischen Genen der *waltzer-shaker*- und der *deaf*-Gruppe Alleliebeziehungen bestehen und ob weitere Kombinanzwirkungen in Doppelheterozygoten auftreten. Auch sollen Beobachtungen über den Zeitpunkt des Ertaubens beschrieben werden.

Die Entwicklung der anatomischen Veränderungen der gesamten Gruppe ist bereits methodisch einheitlich nach vorwiegend qualitativen Gesichtspunkten von DEOL (1954, 1956a und b) und DEOL und KOCHER (1958) untersucht. Auf Grund der den erwähnten Arbeiten zugrundeliegenden Präparatesammlung und einiger zusätzlicher eigener Präparate wurden nun die Degenerationsmodi des Scala media-Komplexes (Veränderungen der Stria vascularis, des Cortischen Organs und des Spiralganglions) vergleichend-quantitativ zu erfassen versucht. Die Mittelohren (soweit auf den Präparaten erfaßt) wurden ebenfalls untersucht. Die Veränderungen im vestibulären Teil des Labyrinths sind für quantitative Untersuchungen weniger geeignet, sie wurden daher nicht weiter bearbeitet.

Prüfung auf Allelie und Kombinanzeffekte in Doppelheterozygoten

Homozygote für die Gene „*df*“, *dn*, *sh-1*, *sh-2*, *pi*, *je* und *v* wurden in sämtlichen 21 möglichen Kombinationen miteinander gekreuzt. 2—3 Würfe jeder Genkombination wurden mindestens über die Zeit von 6 Monaten gehalten und in monatlichen Abständen auf ihre Reaktion auf Schall geprüft. Aus raum- und haltungstechnischen Gründen hatte ich mich zu entschließen, die meisten Würfe, die nach 6 Monaten post partum noch normal auf den Schallreiz reagierten, vom Versuchsbestand abzustreichen. Jedoch wurden Würfe dann weitergehalten, wenn sie ein Nachlassen der Hörfähigkeit vermuten ließen.

Züchtungstechnisches. Für Erzeugung von Genkombinationen zwischen der *waltzer-shaker*- und der *deaf*-Gruppe mußte der Vater aus der *waltzer-shaker*-Gruppe, die Mutter aus der *deaf*-Gruppe stammen. Der verhaltensgestörte Vater wurde vor der Geburt des Wurfes aus dem Zuchtkasten entfernt. Unterlassung dieser Vorsichtsmaßnahme hatte meist den Verlust von Würfen zur Folge. Stammten beide Eltern aus der *waltzer-shaker*-Gruppe, so war eine Aufzucht des Wurfes durch die *waltzer-shaker*-Mutter auch nach vorherigem Entfernen des Vaters unmöglich. Diese Würfe wurden daher an Nicht-*waltzer-shaker*-Ammen übertragen.

Hörprüfung. Für die Hörprüfung wurde der von GRÜNEBERG et al. (1940) und später von DEOL übernommene Test in modifizierter Form beibehalten, da mit ihm die Alternativfrage „hörend oder taub?“ bei den vorliegenden Mutanten in jedem Fall einwandfrei zu entscheiden ist. Dieser Test kann von einer Person allein ausgeführt werden. DEOL hatte den Ohrmuschelreflex der im Zuchtkasten sitzenden Tiere beobachtet. Ich wendete die folgende Technik an:

Die zu testende Maus wurde am Schwanz hängend der Oberkante der Wand eines Zuchtkastens genähert, woran sie sich mit den Vorderpfoten festhielt. Der Rumpf hing, etwas

¹ In dieser Arbeit wird „Kombinanzwirkung“ nicht in derselben speziellen Bedeutung wie bei HADORN (1955) gebraucht.

aus der Horizontalen gehoben, gegen den Beobachter, die Hinterbeine und das distale Schwanzende waren frei. Nachdem sich das Tier beruhigt hatte, wurde durch Anschlagen eines Metallstücks an eine leere Gasflasche ein kurzer, hoher Ton erzeugt. Eine normal hörende Maus erwidert den Schallreiz mit einem Zusammenzucken des ganzen Körpers, ruckartigem Anziehen der Hinterbeine, eventuell einem kleinen, raschen Ausschlag der Schwanzspitze und raschem Zurückklappen der Ohrmuscheln (Preyerscher Ohrmuschelreflex). Taube Tiere sind durch ihre völlige Teilnahmslosigkeit am akustischen Geschehen leicht zu erkennen.

Noch nicht entwöhnte Nestlinge wurden zwischen den Fingern in ihrer Brustregion festgehalten, so daß die Hinterbeine entspannt herunterhingen. Hörende Tiere reagierten auf den Schallreiz mit ruckartigem Anziehen derselben, auch war ein Zusammenzucken des Körpers mit den Fingern zu fühlen. Diese Reaktionen sind vor dem Entwöhnen ein besseres Kriterium der Hörfähigkeit als der Ohrmuschelreflex. Übertragung von etwaigen unbewußten Reaktionen des Beobachters auf das Versuchstier war nicht zu befürchten, da genetisch taube Tiere bei dieser Art von Testen nie auf den Reizton reagierten.

Die erwähnten Reflexbewegungen scheinen sich innerhalb des Zeitabschnitts, über welchen eine Maus normalerweise im Laboratorium gehalten wird, nicht abzuschwächen: 2jährige normale F_1 -Tiere der Kreuzung der beiden Inzuchtstämme C57BL/Gr und CBA/Gr reagierten auf Schallreize noch mit unverminderter Deutlichkeit.

Tabelle 1. Zahl und Haltungsdauer (bzw. Zeitpunkt des Ertaubens) der verschiedenen Doppelheterozygoten und des Compounds v/v^{df}

Jedes Feld repräsentiert die Kombination der am linken und am unteren Rand aufgeführten Gene in einfacher Dosis. Arabische Ziffern = Anzahl der Tiere. Römische Ziffern = Haltungsdauer in Monaten. h = hörend, (h) = schwerhörig, t = taub. Ertaubte Würfe sind dick umrandet

dn	10 h XII					
	7 h VI 6 h IX					
$sh-1$	2 t, 1 (h) III 4 t, 1 (h) V 3 t, 3 h VI	11 h VI 9 h IX				
$sh-2$	5 h XI	8 h VI	5 h VI			
pi	5 h VII	12 h VI	4 h VI 3 h VII 1 h IX 1 h X	5 h VI 3 h VII		
je	3 h VI 4 h VII	7 h VI 6 h VII	4 h IX	8 h VI 1 h XII 3 h XVII	7 h VI 4 h VII	
v	93 t 3.—4. Woche	10 h VI	3 t XVI 3 t XVIII 1 t, 1 (h) XXI	2 h VI 1 h VII	10 h VI	10 h VI
	v^{df}	dn	$sh-1$	$sh-2$	pi	je

Ergebnisse (Tabelle 1). Plötzliches Ertauben schon in der Zeit des Entwöhnens wurde nur bei der Genkombination v/v^{df} beobachtet, was vermuten ließ, daß die

Gene *v* und „*df*“ Allele sind (Allelietest s. weiter unten). Bei allen übrigen Kombinationen konnte zunächst nach Haltung über die Minimalzeit (und teilweise darüber hinaus) in keinem Fall Taubheit festgestellt werden. Da jedoch eine Kombinanzwirkung bei der Doppelheterozygoten *+/sh-1; +/v* bekannt ist (LORD and GATES 1929, bestätigt durch DEOL 1956a), wurden diese Doppelheterozygoten, die andernfalls ohne die Aufdeckung eines Effekts ausgeschieden worden wären, bis zum Ertauben im 16., 18. und 21. Monat post partum gehalten. Bei der bestehenden Wahrscheinlichkeit einer Allelie von *v* und „*df*“ war auch die Doppelheterozygote *+/sh-1; +/„df“*, von welcher hörende Würfe im Alter von 6 und 9 Monaten ausgeschieden worden waren, auf die Möglichkeit eines späteren Ertaubens zu prüfen. Drei neue Würfe wurden 2 Jahre später als die ersten beiden aufgezogen. Hier trat schon im 3., 5. und 6. Monat post partum Taubheit auf. Der *sh-1*-Stamm war in der Zwischenzeit nicht, der „*df*“-Stamm dagegen neu nach CBA ausgekreuzt worden. Die „*df*“-Mutter des zuerst ertaubten Wurfes entstammt jedoch noch dem unausgekreuzten Bestand.

Der Allelietest von *v* und „*df*“. Um zu prüfen, ob die Gene *v* und „*df*“ allel sind, wurde die F₁ der Kreuzung *v/v* × „*df*“/„*df*“ mit den beiden homozygoten Eltern rückgekreuzt.

Für die Beziehung der beiden Gene *v* und „*df*“ zueinander bestehen folgende Möglichkeiten:
a) Falls die Gene *v* und „*df*“ nicht zueinander allel wären und in verschiedenen Chromosomen lägen, wäre die ursprüngliche Kreuzung folgendermaßen zu definieren:

+/+; *v/v* × +/+; *df/df*.

Die F₁-Generation wäre dann doppelt heterozygot:

+/*v*; +/*df*.

Jedes der beiden rezessiven Gene wäre durch sein vom andern Elter in die Kreuzung eingeführtes normales Allel überdeckt und die F₁ sollte phänotypisch normal sein.

b) Im Falle einer Allelie der beiden Gene *v* und „*df*“ wäre die Kreuzung:

P *v/v* × „*df*“/„*df*“
F₁ *v*/„*df*“

und in Abwesenheit des normalen Allels wären die F₁-Tiere sicher taub (und vielleicht auch bewegungsgestört).

c) Läge der (sehr unwahrscheinliche) Fall vor, daß nicht allele, in verschiedenen Chromosomen liegende Gene *v* und *df* in der Doppelheterozygoten einen frühen Kombinanzeffekt zeigten, so müßten bei Rückkreuzung der Doppelheterozygoten mit den homozygoten Eltern in beiden Fällen 25% hörende Normaltiere aufgetreten sein.

d) Wären *waltzer* und *deaf* zwei eng gekoppelt auf dem gleichen Chromosom liegende Gene, die einen Kombinanzeffekt zeigten, so müßten bei Rückkreuzung der F₁ mit den homozygoten Eltern auch hörende Cross-over-Tiere entstehen.

Tabelle 2 zeigt, daß die F₁ der Kreuzung *waltzer* × *deaf* immer normales Verhalten zeigt und taub ist. Das Gleiche gilt für Würfe der Rückkreuzung der F₁

Tabelle 2. Ergebnisse des Allelietests zwischen *waltzer* und *deaf* (Anzahl der Tiere)

		F ₁	F ₂		Total der F ₂
		<i>waltzer</i> × <i>deaf</i>	F ₁ × <i>deaf</i>	F ₁ × <i>waltzer</i>	
Hörend		0	0	0	0
Taub	Normales Verhalten	93	279	55	379
	<i>waltzer</i>	0	0	45	

mit *deaf*. Auch alle Nachkommen einer Rückkreuzung der F_1 mit *waltzer* sind taub (dabei sind jedoch ungefähr die Hälfte der Tiere bewegungsgestört, während sich die andere Hälfte bewegungsmäßig normal verhält).

Da bei den Rückkreuzungen nie Normaltiere auftraten, ist es höchst wahrscheinlich, daß *v* und „*df*“ Allele sind (daß also oben aufgeführter Fall b vorliegt). Das Symbol für *deaf* wäre nun v^{df} zu schreiben. Die Möglichkeit d, daß *waltzer* und *deaf* zwei eng gekoppelt auf dem gleichen Chromosom liegende Gene sind, ist natürlich nicht völlig ausgeschlossen. Für das vorliegende relativ kleine Zahlenmaterial (379 taube, 0 hörende F_2 -Tiere) wäre der Rekombinationswert zweier eng gekoppelter Gene, bei einer Wahrscheinlichkeit von 19/20, kleiner als 1,6%.

Beobachtungen über Hörfähigkeit und den Zeitpunkt des Ertaubens

Im folgenden seien einige Beobachtungen mitgeteilt, die ich während der 3 Jahre, in denen ich die in dieser Arbeit behandelten Mutanten hielt, über das Ertauben machte.

Shaker-1. 33 junge *sh-1/sh-1* wurden auf Hörfähigkeit geprüft. Alle reagierten beim Entwöhnen auf Schall. Sie ertaubten in der 5. und 6. Woche post partum.

Pirouette. Drei *pi/pi*-Würfe (zusammen 26 Tiere) wurden bis zum Entwöhnen täglich getestet; alle diese Tiere zeigten unzweideutige Reaktionen auf den Schallreiz. Weitere Würfe wurden in mehrtägigen Intervallen getestet. In insgesamt 18 untersuchten Würfen befand sich nur ein einziges (in der Entwicklung stark zurückgebliebenes) Tier, das nie reagierte. Das Ertauben erfolgte meist zwischen dem 2. und 4. Monat post partum. Einige Tiere ertaubten bereits im Alter von 1 Monat. Andererseits wurde eine 7 Monate alte Homozygote noch hörend befunden.

Waltzer. 22 vor dem Entwöhnen getestete *v/v* waren taub. Lediglich in 2 Fällen bestand am 12. und 13. Tag Ungewißheit, ob vereinzelte leichte Reaktionen erfolgten. Jedoch waren auch diese beiden Tiere vom 14. Tag an offensichtlich taub.

In 3 spaltenden Würfen wurde je ein Tier gefunden, das normales Verhalten zeigte, aber taub war. Da in dieser Zeit der *waltzer*-Stamm sehr schlecht züchtete, blieben Versuche, durch Rückkreuzung zu ermitteln, ob es sich um taube $v/+$ - oder nicht bewegungsgestörte v/v -Tiere handelte, erfolglos. Hier ist natürlich auch die Möglichkeit im Auge zu behalten, daß im *waltzer*-Stamm ein bisher unentdecktes rezessives Gen für unkomplizierte Taubheit enthalten gewesen sein könnte.

Deaf. Über eine kurze anfängliche Hörperiode liegen Daten von 16 Würfen vor, die bis zum Entwöhnen täglich getestet wurden. Die letzten 6 Würfe sind F_2 - und Rückkreuzungswürfe nach einer Auskreuzung nach dem *Grey-lethal*-Stamm. Die v^{df}/v^{df} -Tiere hörten ausnahmslos für einige Tage; in den meisten Fällen lag die Hörperiode zwischen dem 12. und 16. Tag. Bei einzelnen Tieren konnte schon am 10. oder 11. Tag eine Reaktion auf Schallreize festgestellt werden. Homozygote Würfe waren beim Entwöhnen meist vollzählig taub. Ein v^{df}/v^{df} -Tier ertaubte erst am 25. Tag post partum. Nach der Auskreuzung hatte sich die Zeitspanne des Hörenkönnens nicht verändert.

Compound v/v^{df} . Die Hörperiode ist die gleiche wie in v^{df}/v^{df} . Beim täglichen Testen wurde beobachtet, daß die Hörperiode entsprechend dem Entwicklungsstand früher oder später liegt: bei Würfen mit gut entwickelten Tieren erfolgen die ersten Reaktionen auf Schall und das Ertauben früher als bei Würfen mit

kleinen, schlecht entwickelten Tieren (Abb. 1). Das zuletzt (am 24. Tag) ertaubte Tier des schlecht entwickelten Wurfes auf Abb. 1 zeigte auch die größte Verzögerung der Entwicklung: am 19. Tag war es mit nur 4.31 g das leichteste der Wurfgeschwister.

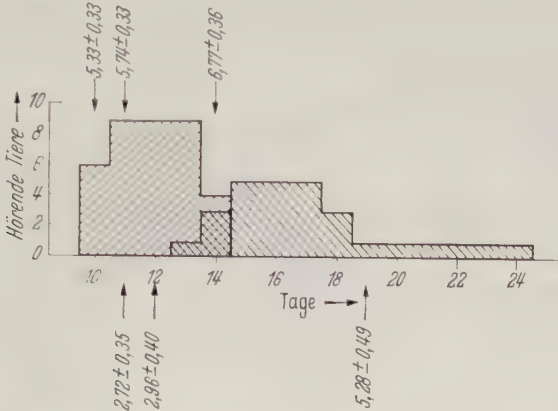


Abb. 1. Kumulatives Diagramm der Hörperiode eines Wurfes von 9 gut (rasch) entwickelten Mäusen des Compounds *v/r^df* (links, Schraffur von links nach rechts ansteigend) und eines Wurfes von 8 schlecht (langsam) entwickelten Mäusen der gleichen genetischen Konstitution (rechts, Schraffur von links nach rechts abfallend). Abszisse: Entwicklungszeit (Tage p. p.). Ordinate: Anzahl der am betreffenden Tag als hörend registrierten Tiere. Über der Abszisse ist das Durchschnittsgewicht (in Gramm) des gut entwickelten Wurfes am 10., 11. und 14. Tag, unter der Abszisse das Durchschnittsgewicht des schlecht entwickelten Wurfes am 11., 12. und 19. Tag angegeben. Infolge größerer individueller Schwankungen hinsichtlich des Einsetzens der Hörperiode und des Ertaubens der einzelnen Wurfgeschwister erreichte die Zahl der gleichzeitig als hörend befundenen Tiere im retardierten Wurf nie die Gesamtzahl (8) der Wurfgeschwister

Anatomische Untersuchungen

1. Allgemeines

Aus den Untersuchungen von DEOL und DEOL und KOCHER lagen parallel zum Modiolus geschnittene Celloidin-Schnittserien vor, in denen ein Großteil der Cochlea, sowie das Mittelohr (und in vielen Fällen auch Sacculus und Utriculus und die Ampullen) erfaßt waren. Alle diese Präparate wurden für die vorliegende Untersuchung verwendet¹. Zusätzlich wurden noch einige Schnittserien einer Entwicklungsreihe des Compounds *v/r^df* und Serien von 26 normalen Kontrollohren (F_1 einer Kreuzung der beiden Inzuchtstämme C57BL/Gr und CBA/Gr) verschiedenen Alters hergestellt. Angaben über die histologische Technik finden sich bei DEOL (1954), DEOL und KOCHER (1958) und KOCHER (1960).

In Abb. 2 ist ein Modiolärschnitt durch eine normale ausgereifte Cochlea dargestellt. Mit nur geringen Abweichungen war diese Orientierung in beinahe allen Präparaten erreicht. Der Ductus cochlearis ist viermal annähernd transversal getroffen: basal in seinem Übergang von dem im Gegensinn zur Schneckenwindung ausgebogenen Caecum vestibulare in die erste Halbwindung (als 0/1 bezeichnet), sodann in den jeweiligen Übergängen zur nächstfolgenden Halbwindung (1/2 bis 3/4). Apikal ist das von Strukturelementen freie Caecum cupulare angeschnitten.

Abb. 3 zeigt die ausgereifte Scala media und das Spiralganglion einer genetisch normalen Maus in der Mittelwindung, Abb. 4 die Scala media einer adulten Homozygoten für ein Taubheitsgen in derselben Region (weitere Abbildungen

¹ Wo in dieser Arbeit für Abbildungen Präparate der Deolschen Sammlung verwendet wurden, ist dies am Ende des Abbildungstextes mit (D.) vermerkt.

finden sich in den Arbeiten von DEOL). Das Mutantenohr unterscheidet sich vom Normalen in den folgenden 3 Punkten: 1. Die Stria vascularis ist in Höhe und Breite reduziert. Dabei ist ihr Gefäßmuster nicht wesentlich verändert. Die Prominentia spiralis ragt nun frei in den Endolymphraum (dies ist ein sicheres Kriterium für auch nur verhältnismäßig geringfügige Reduktionen des Stria-Querschnitts). 2. Im Cortischen Organ fehlen die Haarzellen, die Stützzellen



Abb. 2. Modiolärschnitt durch eine normale ausgereifte Cochlea (Zeichenapparatskizze). Knochen schwarz. 0/1—3/4 = Bezeichnung der Halbwindungen. BM Basilar-membran; Cc Caecum cupulare der Scala media; CO Cortisches Organ; Ls Limbus spiralis; Mt Membrana tectoria; Ps Prominentia spiralis; RM Reissnersche Membran; Sg Spiralganglion; Sv Stria vascularis; Scm Scala media; Sct Scala tympani; Scv Scala vestibuli. Vergr. ungef. 60

sind in Unordnung geraten, sie sind in die Räume des äußeren Tunnels und des Nuelschen Spalts (manchmal auch noch des Cortischen Tunnels) vorgedrungen. 3. Im Spiralganglion ist die Zahl der Ganglienzellen verringert¹.

Diese Triade des Degenerationsmusters wird als „Scala media-Komplex“ bezeichnet (GRÜNEBERG 1956a). Die verschiedenen Mutanten, die Doppelheterozygote $+/sh-1$; $+/v$ und der Compound v_1v^{df} können sich in Geschwindigkeit und Ausmaß der Degeneration der einzelnen Komponenten des Scala media-Komplexes unterscheiden. Im folgenden sind die Ergebnisse vergleichend-quantitativer Untersuchungen jeder Einzelkomponente zusammengestellt.

¹ Einem weiteren Unterschied: daß in vielen Präparaten normaler Ohren die Deckmembran (Membrana tectoria) den Haarzellen aufliegt, während sie sich im Mutantenohr vom Retikulum abgehoben hat, soll hier kein Gewicht beigelegt werden, da ein Sich-Abheben der Deckmembran vom Cortischen Organ gelegentlich auch in normalen Ohren — infolge geringfügiger Unterschiede der Fixation, bzw. der Einbettung — erfolgen kann.

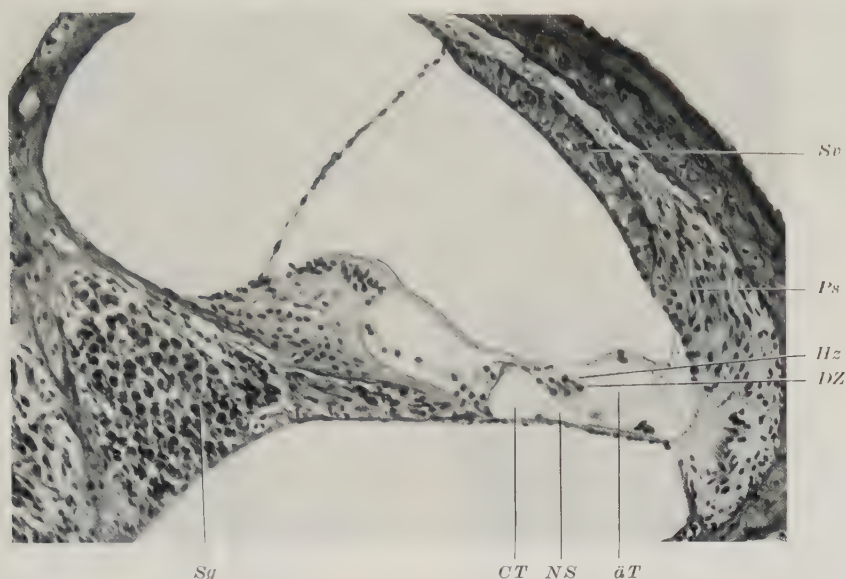


Abb. 3. Scala media und Spiralganglion einer normalen 44 Tage alten $+sh-2$ -Maus (linkes Ohr, Mittelwindung [= Halbwindung 2/3]). Ps Prominentia spiralis; Sv Stria vascularis; Sg Spiralganglion. Cortisches Organ: CT Cortischer Tunnel; NS Nuelscher Spalt; äT äußerer Tunnel; Hz Haarzellen; DZ Deitersche Zellen. Vergr. 170 \times (D.)

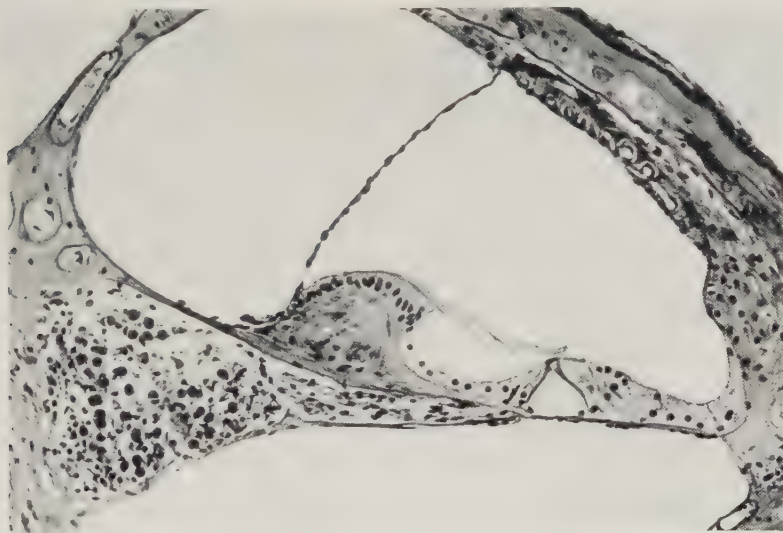


Abb. 4. Scala media und Spiralganglion einer 329 Tage alten vdf/vdf -Maus (linkes Ohr, Mittelwindung [= Halbwindung 2/3]). Vergr. 170 \times (D.)

2. Stria vascularis

a) *Querschnitt-Flächenmessungen.* Bei allen hier bearbeiteten Mutanten beginnt die Degeneration der Stria vascularis basal und schreitet apikalwärts fort.

Daher wurde zur quantitativen Erfassung des Degenerationsverlaufs in jedem präparierten Mutanten- und Normalohr der Striaquerschnitt in den beiden benachbarten Übergängen der Halbwindungen 1/2 und 2/3 gemessen: in der betreffenden Schnittserie wurde ein möglichst

genau durch den Modiolus verlaufender Schnitt ausgesucht, nach diesem wurde je eine Projektionszeichnung des Striaumrisses in den Windungsübergängen 1/2 und 2/3 bei 475facher linearer Vergrößerung angefertigt (Abb. 5a und b) und planimetriert. Die Mittelwerte der Messungen in verschiedenen Altersgruppen sind (in Quadratzentimetern der Planimetermessung angegeben) in den Tabellen 3 und 4 zusammengefaßt.

Im normalen Ohr wächst der Striaquerschnitt in beiden Übergängen 1/2 und 2/3 ungefähr bis zum 20. Tag post partum und bleibt dann konstant (Abb. 12, S. 130).



Abb. 5. a Querschnitte der normalen Stria vascularis in der Mittelwindung (Halbwindung 2/3). Von den Projektionszeichnungen von 14 normalen Kontrollohren (F_1 der Kreuzung CBA \times C57BL) wurde diejenige mit dem größten Planimeterwert (links), die dem Mittelwert am nächsten liegende (Mitte) und diejenige mit dem kleinsten Planimeterwert (rechts), sowie 2 Zwischenwerte herausgegriffen. Alter über 300 Tage. Die mit einem Stern markierten Querschnitte wurden für den Formvergleich spiegelbildlich wiedergegeben. Ansatz der Reissnerschen Membran oben. Lineare Vergrößerung 275 \times . b Striaquerschnitte in der Mittelwindung tauber dn/dn -Mäuse. Von den Projektionszeichnungen von 16 Ohren aller über 300 Tage alten dn/dn wurden 5 Fälle herausgegriffen (Auswahl und Anordnung wie in Abb. 5a). Lineare Vergrößerung 275 \times .

Die Streuung der Meßwerte ist in der Mittelwindung (2/3) kleiner als in der Basalwindung (1/2). Dies ist darauf zurückzuführen, daß der Ductus cochlearis auf dem Schnitt in 2/3 in einem stumpferen Winkel getroffen ist als in 1/2, wo er noch eine steilere Steigung besitzt; kleinere Abweichungen im Schnittwinkel und in der Steigung des Ductus cochlearis wirken sich daher in 1/2 stärker aus als in 2/3. Aus diesem Grund mußte auf die Messung der Querschnittsfläche im Beginn der ersten Windung (Übergang 0/1) verzichtet werden.

Der Degenerationsmodus der Stria ist für alle Mutanten prinzipiell gleich: in der ersten Halbwindung bleibt die Stria-Querschnittsfläche vom Anfang ihres Deutlichwerdens am 3. Tag post partum an hinter derjenigen der normalen Kontrollen zurück. In der 2. Halbwindung (2/3) unterscheidet sich die Querschnittsfläche anfangs noch nicht vom Normalen. Während sie jedoch bei normalen Tieren bis zum 20. Tag noch ansteigt, fällt sie vom 10. Tag an bei den Mutanten ab. Der Degenerationsmodus von $Va/+$ entspricht quantitativ

Tabelle 3. Mittelwerte der Striaquerschnitte in verschiedenen Altersgruppen bei normalen Kontrollen und deaf-walker-shaker-Mutanten. Übergang der Halbwindungen 1/2. Zahl der Fälle in Klammern. Va/Va wurde von der Errechnung der Gesamtmittelwerte ausgeschlossen.

	Altersgruppen (Tage)					
	3—10	11—20	21—100	101—300	> 300	
Normale Kontrollen . . .	12,22 ± 2,05 (8)	14,00 ± 1,90 (20)	14,63 ± 2,44 (41)	14,41 ± 2,58 (17)	13,22 ± 1,36 (19)	
Total	$\left\{ \begin{array}{l} dn/dn \\ edf/pdf \\ v/v \\ pi/pi \\ je/je \\ sh-1/sh-1 \\ sh-2/sh-2 \\ Va/+ \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 10,5 (1) \\ 12,95 \pm 1,06 (2) \\ 12,4 (1) \\ 10,55 \pm 4,59 (2) \\ 7,08 \pm 2,23 (4) \\ 10,40 \pm 1,51 (6) \\ 11,30 \pm 1,83 (7) \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 10,03 \pm 1,18 (8) \\ 12,03 \pm 1,76 (3) \\ 8,65 \pm 0,23 (2) \\ 12,08 \pm 2,65 (7) \\ 9,40 \pm 1,80 (5) \\ 10,10 \pm 1,61 (5) \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 9,87 \pm 1,41 (7) \\ 11,15 \pm 1,45 (4) \\ 10,05 \pm 1,21 (2) \\ 8,60 \pm 1,21 (4) \\ 12,18 \pm 1,86 (8) \\ 9,80 \pm 1,15 (3) \\ 10,58 \pm 2,72 (8) \\ 11,83 \pm 1,02 (11) \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 10,47 \pm 1,86 (6) \\ 9,73 \pm 1,74 (4) \\ 9,90 \pm 1,64 (6) \\ 7,44 \pm 3,36 (5) \\ 11,00 \pm 1,13 (2) \\ 11,07 \pm 0,41 (3) \\ 7,58 \pm 2,34 (4) \\ 12,40 \pm 0,99 (2) \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 7,41 \pm 2,23 (16) \\ 9,42 \pm 2,08 (5) \\ 8,0 (1) \\ 1,9 (1) \\ 9,65 \pm 4,26 (4) \\ 8,83 \pm 1,62 (3) \\ 7,95 \pm 3,61 (2) \\ 7,5 (1) \end{array} \right.$
	Va/Va		8,0 (1)	5,02 ± 1,36 (5)		
	Gesamtmittelwert $\overline{SM} . . .$	10,42 ± 0,81 (23)	10,52 ± 0,55 (30)	10,85 ± 0,45 (47)	9,64 ± 0,59 (32)	8,00 ± 1,41 (33)
	Relative Striafläche $S_r . .$ (aus Varianz-ratio-Test)	$\left. \begin{array}{l} > 5\% < 10\% (\sim 5\%) \\ 85\% \end{array} \right\}$	$\left. \begin{array}{l} > 5\% < 10\% \\ 75\% \end{array} \right\}$	$\left. \begin{array}{l} > 1\% < 5\% \\ 74\% \end{array} \right\}$	$\left. \begin{array}{l} > 5\% < 10\% \\ 67\% \end{array} \right\}$	$\left. \begin{array}{l} > 0,1\% < 1\% \\ 61\% \end{array} \right\}$

Tabelle 4. Mittelwerte der Striaquerschnitte. Übergang der Halbwindungen 2/3. Gleiche Darstellung wie Tabelle 2

	Altersgruppen (Tage)					
	3—10	11—20	21—100	101—300	> 300	
Normale Kontrollen . . .	8,34 ± 0,84 (8)	10,48 ± 1,47 (20)	10,73 ± 1,31 (41)	10,36 ± 1,23 (17)	10,55 ± 1,12 (19)	
Total	$\left\{ \begin{array}{l} dn/dn \\ edf/pdf \\ v/w \\ pi/pi \\ je/je \\ sh-1/sh-1 \\ sh-2/sh-2 \\ Va/+ \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 8,1 (1) \\ 10,05 \pm 1,49 (2) \\ 9,4 (1) \\ 7,75 \pm 4,73 (2) \\ 7,63 \pm 2,29 (4) \\ 8,03 \pm 1,12 (6) \\ 8,91 \pm 1,70 (7) \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 7,96 \pm 1,44 (8) \\ 7,90 \pm 2,51 (3) \\ 7,00 \pm 0,99 (2) \\ 8,70 \pm 1,07 (7) \\ 7,40 \pm 0,82 (5) \\ 7,54 \pm 1,57 (5) \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 7,06 \pm 1,09 (7) \\ 7,88 \pm 1,38 (4) \\ 7,35 \pm 0,92 (2) \\ 5,93 \pm 1,09 (4) \\ 7,83 \pm 1,95 (9) \\ 7,33 \pm 1,21 (3) \\ 7,53 \pm 1,20 (8) \\ 8,28 \pm 1,06 (12) \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 6,02 \pm 1,03 (6) \\ 5,10 \pm 1,12 (4) \\ 4,42 \pm 2,52 (6) \\ 4,32 \pm 3,14 (5) \\ 9,70 \pm 1,56 (2) \\ 5,13 \pm 3,31 (3) \\ 6,43 \pm 0,98 (4) \\ 8,75 \pm 0,35 (2) \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} 4,81 \pm 1,67 (16) \\ 7,12 \pm 1,42 (5) \\ 7,5 (1) \\ 6,4 (1) \\ 7,80 \pm 0,50 (4) \\ 4,57 \pm 1,83 (3) \\ 2,80 \pm 2,40 (2) \\ 6,5 (1) \end{array} \right.$
	Va/Va		9,4 (1)	4,70 ± 1,74 (5)		
	Gesamtmittelwert $\overline{S_M} . .$	8,44 ± 0,42 (23)	7,92 ± 0,26 (30)	7,58 ± 0,25 (49)	5,71 ± 0,37 (32)	5,56 ± 0,28 (33)
	Relative Striafläche $\overline{S_r} .$ ρ (aus Varianz-ratio-Test)	$\sim 100\%$ > 20%	76% > 20%	71% > 10% < 20%	55% > 20%	53% > 20%

demjenigen der Homozygoten der rezessiven Gene, derjenige von Va/Va ist ausgeprägter: hier fällt die Stria-Querschnittsfläche bereits in der Mittelwindung 2/3 von Anfang an ab. Ob in den Tabellen 3 und 4 zum Ausdruck kommende kleinere quantitative Unterschiede für die betreffenden Gene typisch sind, läßt sich bei der vorliegenden Anzahl von Präparaten und den zweifellos bestehenden Verschiedenheiten im genotypischen Milieu der verschiedenen Stämme nicht entscheiden. Wie die beiden Tabellen 3 und 4 zeigen, ergibt der Varianz-ratio-Test für die meisten Altersgruppen der Mutanten F-Werte, die ein $p > 5\%$ liefern, d. h.

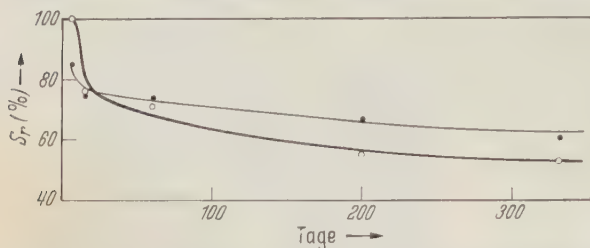


Abb. 6. Degenerationsmodus aller Mutanten-Striaquerschnittsflächen (Va/Va ausgenommen) in der Halbwindung 1/2 (schwache Kurvenlinie) und 2/3 (starke Kurvenlinie). Weitere Erläuterungen im Text

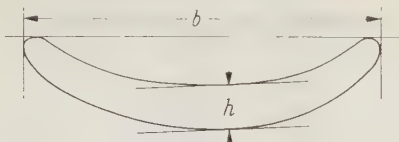


Abb. 7. Maßstrecken für die Bestimmung der Breite b und der Höhe h des Querschnitts der Stria vascularis

die einzelnen Altersgruppen können in ihrer Gesamtheit (Va/Va ausgenommen; in Tabelle 3 und 4 mit „Total“ bezeichnet) als statistisch homogene Gruppen aufgefaßt werden. Daher wurde aus den Gesamtmittelwerten $\overline{S_M}$ der Mutanten-Striaquerschnitte der verschiedenen Altersgruppen und den entsprechenden Mittelwerten $\overline{S_K}$ aller normalen Kontrollen die relative mittlere Striafläche der Mutanten

$$S_r = \frac{\overline{S_M} \cdot 100}{\overline{S_K}} \%$$

für beide Schnittflächen der Schnecke, 1/2 und 2/3 errechnet und als Degenerationsmodus beider Halbwindungen für die Gesamtheit aller Mutanten in Abb. 6 zusammengefaßt.

b) *Lineare Messungen.* Mit dem Okularmikrometer wurden Höhe und Breite der normalen und der Mutanten-Striae bestimmt. Abb. 7 zeigt die Maßstrecken am Beispiel eines normalen Striaquerschnitts. Für die Breite war der Abstand der senkrecht auf der Sehne stehenden Tangenten, für die Höhe der Abstand der Tangenten des Umriß-Kurvenverlaufs an der dicksten Stelle maßgebend. Da der Degenerationsmodus der Stria bei allen hier bearbeiteten Mutanten derselbe ist, wurden die linearen Messungen auf die Mittelwindung (2/3) von normalen Kontrollen, dn/dn , $sh-2/sh-2$ und $Va/+$ beschränkt und alle 3 Mutanten zur Errechnung der Mittelwerte der verschiedenen Altersgruppen zusammengekommen (Tabelle 5).

Im normalen Ohr hat die Stria bereits im Zeitpunkt ihrer Abgrenzung von der Umgebung am 3. Tag post partum ihre definitive Höhe erreicht. Der Zuwachs ihrer Querschnittsfläche während der ersten 20 Tage ist lediglich auf Breitenzunahme zurückzuführen. Die Breite der Mutantenstria nimmt zunächst parallel zur Normalkurve zu, ohne jedoch deren Endwert zu erreichen und fällt dann mit zunehmendem Alter leicht ab. Die Höhe dagegen nimmt bereits vor dem 20. Tag beträchtlich ab, bleibt dann ungefähr gleich und beginnt erst im Alter von über 300 Tagen weiterhin abzufallen.

c) *Die Querschnittsfläche der Scala media.* Es wäre möglich, daß sich bei Mutanten nicht nur die Querschnittsfläche der Stria vascularis verringert, sondern daß auch das Wachstum

des gesamten Scala media-Querschnitts gegenüber dem Normalen zurückbliebe. Daher wurde die Querschnittsfläche der Scala media der normalen Kontrollen und der Mutanten in der Mittelwindung (2/3) gemessen. Es zeigte sich kein Unterschied. Das Wachstum des Lumens der Scala media ist gleich dem des normalen Striaquerschnitts am 20. Tag beendet.

3. Das Cortische Organ

Auch für den Degenerationsverlauf des Cortischen Organs gilt, wie für den der Stria vascularis, daß er basal beginnt und apikalwärts fortschreitet. Die qualitativen Veränderungen sind: Indifferentwerden der Stützzellen, Einwachsen der indifferenten Zellen in die Tunnelräume, Degeneration und Verlust der Haarzellen. Letzteres ist das sicherste und am einfachsten quantitativ erfaßbare Kriterium. Daher wurde für alle vier im Schnitt getroffenen Schneckenpartien festgestellt, ob die äußeren Haarzellen noch normal waren, degenerierten oder fehlten. Im Normalzustand liegen auf Querschnitten durch den Ductus cochlearis die Zellkerne der drei äußeren Haarzellen in einer geraden, ungefähr zur Basilarmembran parallel verlaufenden Reihe (Abb. 3). Die Kerne der die Haarzellen tragenden Deitersschen Zellen sind darunter in einer Parallelreihe angeordnet. Das erste Anzeichen beginnender Degeneration ist ein Auseinanderrücken und aus der Ordnung geraten der beiden Kernreihen. Benachbarte Stützzellen können nun in die ehemalige Position beider Zellreihen vordringen, so daß ein Zellkern auf Grund seiner Lage allein nicht mehr seinem ursprünglichen Zelltyp zugeschrieben werden kann (Abb. 4). Haarzellkerne unterscheiden sich jedoch sowohl im Normalzustand wie auch in der Degeneration von den Stützzellkernen durch ihre intensivere Färbung. Damit war ihre Einordnung in die Kategorien „normal“, „degenerierend“ oder „fehlend“ auf jedem Schnitt des Ductus cochlearis möglich.

Wie aus Abb. 8 hervorgeht, ist vor dem 12. Tag keine Abnormität der Haarzellen zu erkennen. Der weitere Verlauf der Degeneration ist typisch für jede Mutante und das Endstadium eines haarzellenlosen Cortischen Organs ist bei den einzelnen Mutanten in verschiedenem Alter erreicht. Am raschesten erfolgt die Degeneration bei $Va/+$ und Va/Va , am langsamsten bei v^{df}/v^{df} . Leider liegen für $sh-1$ nur 2 Präparate von Tieren jünger als 100 Tage vor.

Tabelle 5. Durchschnittswerte der mittleren Breite und Höhe des Striaquerschnittes in der Mittelwindung innerhalb der verschiedenen Altersgruppen normaler Kontrollen und der deaf-waltzer-shaker-Mutanten (Messungen an dn/dn , $sh-2/sh-2$ und $Va/+$)
Die Mittelwerte sind in Mikrometereinheiten angegeben (256 E = 0,1 mm). Zahl der Fälle in Klammern

	Altersgruppen (Tage)				
	3—10	11—20	21—100	101—300	> 300
Breite	Normale Kontrollen <i>deaf-waltzer-shaker</i> -Mutanten .	497,0 ± 59,3 (8) 471,5 ± 39,5 (14)	540,1 ± 62,5 (18) 515,3 ± 39,9 (21)	565,8 ± 47,0 (16) 535,1 ± 45,3 (17)	540,8 ± 37,9 (11) 521,6 ± 28,6 (8)
Höhe	Normale Kontrollen <i>deaf-waltzer-shaker</i> -Mutanten .	70,5 ± 11,4 (8) 67,2 ± 11,5 (14)	64,6 ± 7,8 (18) 52,6 ± 7,5 (21)	65,9 ± 7,0 (16) 53,1 ± 6,5 (17)	69,2 ± 8,4 (11) 52,6 ± 6,9 (8)
					559,5 ± 50,6 (16) 478,3 ± 48,8 (9) 66,0 ± 5,7 (16) 42,6 ± 11,6 (9)

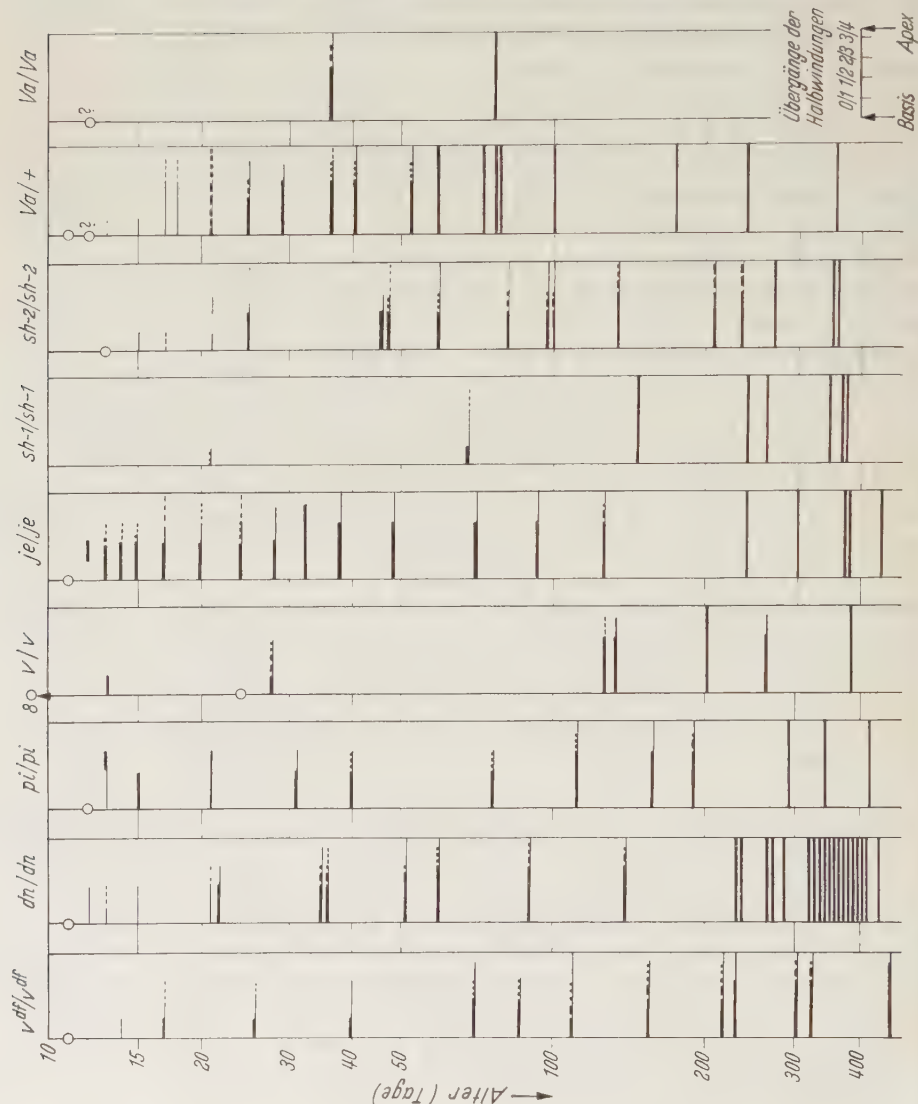


Abb. 8. Degenerationsverlauf der äußeren Haarzellen in allen Einzelfällen aller *dent-vallier-shaker*-Mutanten. Die durch die beiden Vertikalen abgegrenzte Breite jedes Feldes einer Mutante repräsentiert die Gesamtlänge der Stria vascularis von ihrem basalen (links) bis zu ihrem apikalen Ende (rechts) (Unterschiede der Abstände zwischen den auf dem Modiolarschnitt getroffenen Halbwindungs-Übergängen 0/1—3/4 wurden für diese Darstellung vernachlässigt). Abszisse: Alter (Tage p. p.) logarithmisch aufgetragen. Die in den Feldern verlaufenden Horizontalen stellen den jeweiligen Grad und die Ausdehnung der Degeneration der äußeren Haarzellen in einer Mutantencochlea des betreffenden Alters dar: schwache Linie = Haarzellen noch vorhanden, aber degenerierend; schwache Linieunterbrochen = Haarzellen stellenweise noch normal, stellenweise degenerierend. Starke Linie = Haarzellen fehlend; starke und schwache Linie alternierend = Haarzellen stellenweise fehlend, stellenweise noch vorhanden, aber in Degeneration. Im freien Abschnitt des Feldes sind die Haarzellen normal. Die letzte Cochlea der jeweiligen Entwicklungsserie, deren Haarzellen überall noch normal sind, ist durch einen Kreis am Basalende des Feldes bezeichnet (? = möglicherweise schon mit stellenweiser leichter Degeneration)

Sollten diese repräsentativ für den Degenerationsmodus dieser Mutante sein, so läge im längeren Vorhandensein großenteils normaler Haarzellen eine anatomische Entsprechung zu ihrer 4—6wöchigen Hörperiode.

Es fällt auf, daß auch bei den Mutanten *v^{df}*, *pi* und *v*, von welchen anfängliche kürzere oder längere Hörperioden bekannt sind, länger eine apikale normale Haarzellenbesetzung erhalten bleibt als bei *dn*, *je*, *sh-2* und *Va*, wo keine Hörperioden bekannt sind.

4. Das Spiralganglion (Abb. 9)

In den vier auf den Präparaten getroffenen Schnitten durch das Spiralganglion (Abb. 2, 10 und 11) wurde die Dichte der Ganglienzellen im Schätzverfahren ermittelt nach der Stufenfolge: 4 (— ganze Querschnittsfläche des Rosenthalschen Kanals (Canalis spiralis modioli) ist von Ganglienzellen erfüllt), 4- (— leichte Auflockerung der Dichte der Ganglienzellen), 3, 2, 1 (— ungefähr 3/4, 1/2, bzw. 1/4 des Rosenthalschen Kanals ist noch mit Ganglienzellen ausgefüllt), + (— nur noch wenige Ganglienzellen vorhanden) und 0 (— Rosenthalscher Kanal leer). Im Normalfall ist die Dichte in den vom Schnitt getroffenen Halbwindungen von basal nach apikal 2, 4, 4, 4 (Abb. 9 und 10).

Abb. 9 zeigt, daß sich *Va/+* und *Va/Va* im Degenerationsverlauf des Spiralganglions deutlich von den übrigen Mutanten unterscheiden: die Degeneration setzt hier früher und rascher ein, oft ist sie im Übergang der Halbwindungen 1/2 am stärksten, während in der basalen Schnittfläche 0/1 noch relativ mehr oder mindestens gleich viele Ganglienzellen erhalten geblieben sind, d. h. das Zelldichteprofil ist wannenförmig. Bei den übrigen Mutanten setzt die Degeneration basal ein, schreitet dort weiter fort und breitet sich im allgemeinen apikalwärts aus (einige fortgeschrittene Stadien verschiedener Mutanten weichen allerdings apikal von dieser Regel ab). Für jede Mutante läßt sich (bei dem gegebenen genotypischen Milieu) die Zeitspanne angeben, innerhalb welcher die Degeneration einsetzt und der Zeitpunkt, nach dem in jedem Fall deutlich ausgeprägter Ganglienzellausfall beobachtet werden kann (Tabelle 9, S. 137). Die Degeneration scheint im Endzustand bei den einzelnen Mutanten ein verschiedenes Ausmaß zu erreichen, zum mindesten wird die maximale Degeneration in den verschiedenen Mutanten zu verschiedenen Zeitpunkten erreicht. Die größte und rascheste Reduktion der Zelldichte findet bei *dn/dn* statt, wo bei über 250 Tage alten Tieren das Ganglion in seiner ganzen Ausdehnung bis auf einige wenige Restzellen entleert ist (Abb. 9 und 11). Jede Mutante hat somit auch im Spiralganglion ihren charakteristischen Degenerationsmodus.

Vergleicht man den Degenerationsmodus von Mutanten, in welchen Hörperioden nachgewiesen sind, mit dem Degenerationsmodus der übrigen, von Anfang an tauben Mutanten, so findet man beim Spiralganglion nicht die eindeutige Entsprechung zwischen Degenerations-Geschwindigkeit und -Ausmaß einerseits und temporärer Hörfähigkeit andererseits, die für die äußeren Haarzellen besteht: langsame Degeneration des Spiralganglions liegt nicht nur bei *v^{df}*, *pi* (und wahrscheinlich auch *v*) vor (Hörperioden nachgewiesen), sondern auch bei *je* (von Anfang an taub). Das Spiralganglion von *sh-1* scheint mindestens ebenso rasch zu degenerieren wie dasjenige von *sh-2*, das in dieser Beziehung eine Mittelstellung einnimmt. Auf jeden Fall erreicht es stärkere Ausdünnungen. Trotzdem hört *sh-1* einige Wochen, während *sh-2* von Anfang an taub ist.

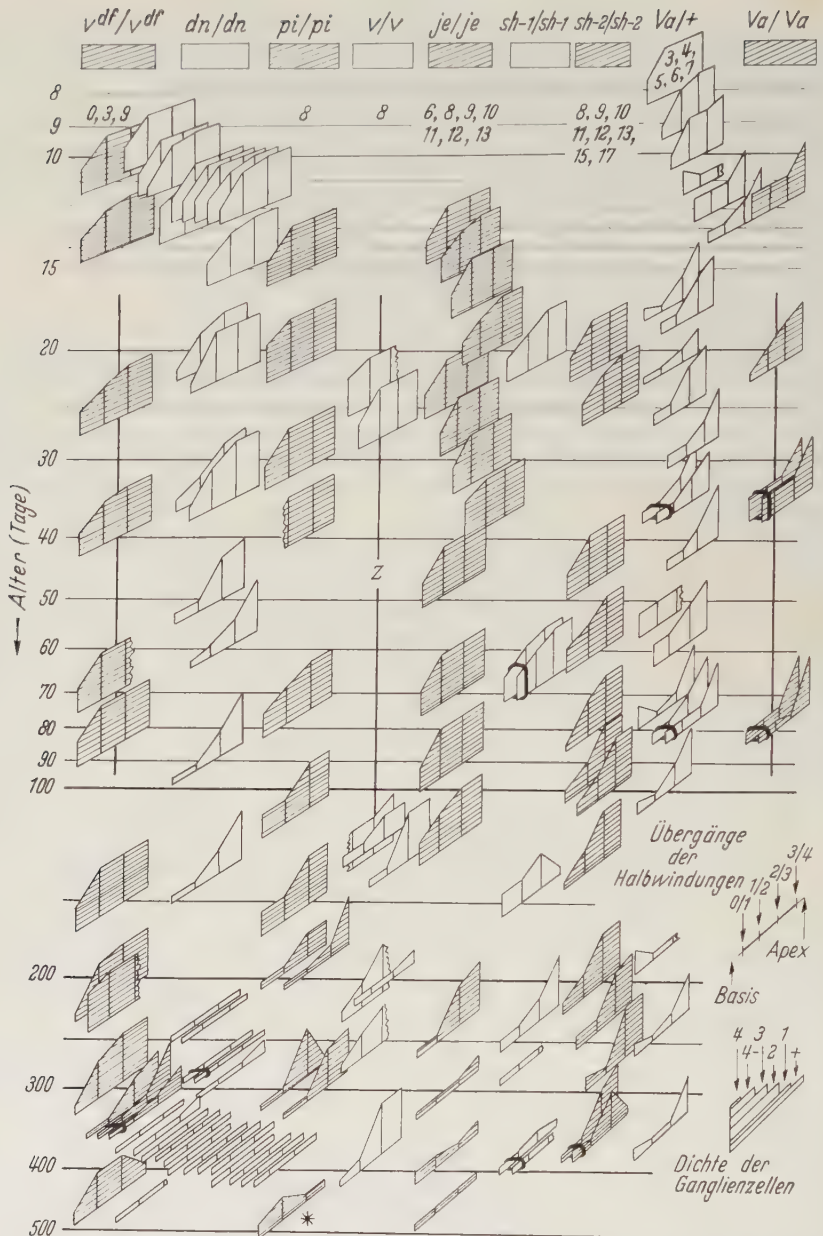


Abb. 9. Degenerationsmodus des Spiralganglions aller *deaf-waltzer-shaker*-Mutanten. Dreidimensionale Darstellung. Die schematischen Rekonstruktionen der Dichte der Ganglienzellen von der basalen (0/1) bis zur apikalen Halbwindung (3/4) jeweils eines Spiralganglions liegen für jede Mutante in der durch die Zeitachse (Z) laufenden Ebene; folgen mehrere Rekonstruktionen zeitlich dicht aufeinander, so sind die Einzelfälle parallel zu dieser Ebene seitlich verschoben. Durch ein Band zusammengehaltene Rekonstruktionen stammen von den beiden Ohren des gleichen Tieres. Das Alter ist logarithmisch aufgetragen. Die Grundlinie jeder Rekonstruktionsfigur schneidet mit ihrer Mitte (zwischen 1/2 und 2/3) auf der Zeitachse Z das Alter des betreffenden Tieres. So ist z. B. das Alter der Tiere, von welchen die Rekonstruktionen in der v^{df}/v^{df} -Reihe stammen, 11, 14, 26, 40 usw., Tage. Die Normalverhältnisse (Ganglienzelldichte 2,4,4,4) werden z. B. durch die ersten Rekonstruktionen der Spiralganglien von v^{df}/v^{df} , dn/dn und pi/pi repräsentiert. Weitere untersuchte jüngere Stadien, die Normalverhältnisse aufweisen, wurden nicht dargestellt; sie sind durch Zahlen, die ihr Alter angeben, bei der betreffenden Mutante vermerkt. Das mit * gekennzeichnete Spiralganglion in der *pirouette*-Reihe gehört einem mittelohrgeschädigten Tier an (Näheres s. S. 134).



Abb. 10



Abb. 11

Abb. 10. Spiralganglion einer normalen 162 Tage alten Maus (F_1 der Kreuzung der beiden Inzuchtstämme CBA und C57BL) in allen Windungen (rechtes Ohr). Vergr. 66 \times

Abb. 11. Spiralganglion einer 387 Tage alten *dn/dn*-Maus in allen Windungen (rechtes Ohr). Vergr. 66 \times (D.)

5. Quantitative Untersuchungen des Scala media-Komplexes bei der Doppelheterozygoten $+/v$; $+/sh-1$ und beim Compound v/v^{df}

a) *Stria vascularis*. Die Planimetermessungen des Striaquerschnittes in den Übergängen der Halbwindungen 1/2 und 2/3 der Doppelheterozygoten $+/v$; $+/sh-1$ und des Compounds v/v^{df} sind in Abb. 12 dargestellt. Der Degenerationsmodus der Stria ist in beiden Fällen der gleiche. Er entspricht dem Degenerationsmodus der den beiden Genkombinationen zugrunde liegenden Mutanten.

b) *Spiralganglion*. Die Zelldichte im Spiralganglion in den 4 Schnittflächen ist in Tabelle 6 in Form von Mittelwerten der verschiedenen Altersklassen angegeben: in beiden Entwicklungsserien beginnt die Ausdünnung der Ganglienzellmasse basal, jedoch setzt in einigen Fällen sowohl bei der Doppelheterozygoten $+/v$; $+/sh-1$ wie auch beim Compound v/v^{df} (bei Tieren älter als 200 Tage) auch apikal (Halbwindungs-Übergang 3/4) die Degeneration ein. Die Mittelwindung (2/3) ist immer normal mit Zellen gefüllt.

c) *Die Haarzellen im Cortischen Organ* (Abb. 13). Die Degeneration der Haarzellen setzt (entsprechend der verschiedenen langen Hörperioden) beim Compound v/v^{df} früher ein als bei der Doppelheterozygoten $+/v$; $+/sh-1$ und verläuft bei ersterem bedeutend rascher: im Ohr des 23tägigen v/v^{df} hat die Degeneration in

Tabelle 6. Mittelwerte der Ganglienzelldichte des Spiralganglions bei normalen Kontrollen, bei der Doppelheterozygoten $+v$; $+sh-1$ und beim Compound v/v^{df}

Zelldichte nach Stufen 1–4 (vgl. S. 127 und Abb. 9). Jeweils die linke Zahl entspricht der mittleren Zelldichte im Halbwindungs-Übergang 0/1, die folgenden den Zelldichten bis zum Halbwindungs-Übergang 3/4. Zahl der Fälle in Klammern.

	Altersgruppen (Tage)											
	21–100				101–300				> 300			
Normale Kontrollen	2,0	4,0	4,0	4,0	2,0	4,0	4,0	4,0	2,0	4,0	4,0	4,0
$+v$; $+sh-1$	2,2	3,9	4,0	4,0 (6)	1,6	3,9	4,0	3,0 (8)	1,0	3,5	4,0	3,9 (2)
v/v^{df}	1,9	3,8	4,0	4,0 (7)					0,8	2,1	4,0	1,6 (4)

der unteren Hälfte der Schnecke bereits begonnen. Letzte normal verbliebene Haarzellen sind in einem 57 Tage alten Tier noch zu erkennen, jedoch bereits bei einem 100tätigen fehlen sie in sämtlichen Windungen. Bei der Doppelheterozygoten $+v$; $+sh-1$ dagegen sind die Verhältnisse am 26. Tag noch durchweg normal und selbst beim ältesten Tier (334 Tage) sind in der oberen Hälfte der Cochlea noch relativ viele erst in Degeneration befindliche Haarzellen zu finden.

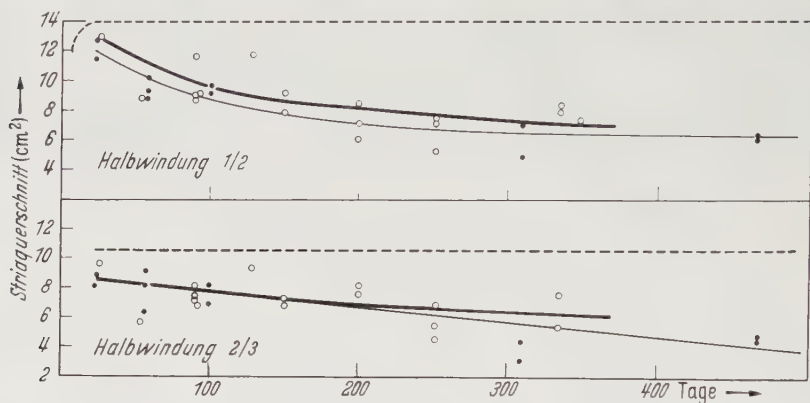


Abb. 12. Abnahme der Querschnittsfläche der Stria vascularis bei der Doppelheterozygoten $+v$; $+sh-1$ (stark ausgezogene Kurve) und beim Compound v/v^{df} (schwach ausgezogene Kurve) in den Übergängen der Halbwindungen 1/2 und 2/3. Unterbrochene Kurve: Querschnittsfläche der normalen Kontrollen. ○ = einzelne Planimeterwerte der Doppelheterozygoten $+v$; $+sh-1$; ● = einzelne Planimeterwerte des Compounds v/v^{df}

Der vestibuläre Teil der Doppelheterozygoten $+v$; $+sh-1$ und des Compounds v/v^{df} . Im Sacculus, Utriculus und in den Cristae der Ampullen konnten bei der Doppelheterozygoten $+v$; $+sh-1$ und beim Compound v/v^{df} keine Anomalien festgestellt werden. Auch das motorische Verhalten schien bei beiden Konstitutionen normal.

6. Nicht genetisch bedingte, gelegentlich auftretende Anomalien

a) Innenohr. In einigen wenigen Fällen wurde eine Wucherung des Periosts, die von der gegenüber der Reißnerschen Membran liegenden Knochenwand in die Scala vestibuli hineinragte, beobachtet (Abb. 14). Sie hat die Form eines kleinen Höckers, besteht aus Bindegewebe und enthält einige Zellkerne. Vorzugsweise tritt sie in der Mittelwindung auf; sie ist häufiger bei alten als bei jungen Tieren. Da sie auch in einem heterozygoten Kontrolltier auftrat, steht sie offenbar

in keiner Beziehung zu den pathologischen Labyrinthveränderungen der Mutanten. Auch die Cochlea einer ungefähr 1 Jahr alten Doppelheterozygoten $+/v; +/sh-1$ wies eine solche Periostwucherung in der Mittelwindung auf.

In der letzten Windung des Spiralganglions wurden bei einem 14tägigen v^{df}/v^{df} , einem 9tägigen je/je und einem über 450 Tage alten pi/pi Zusammenballungen der Ganglienzellen, gefunden, wie sie im C57BL/Gr-Inzuchtstamm und im M^{wh} -Stamm (KOCHER 1960) regelmäßig auftreten. Das pi/pi -

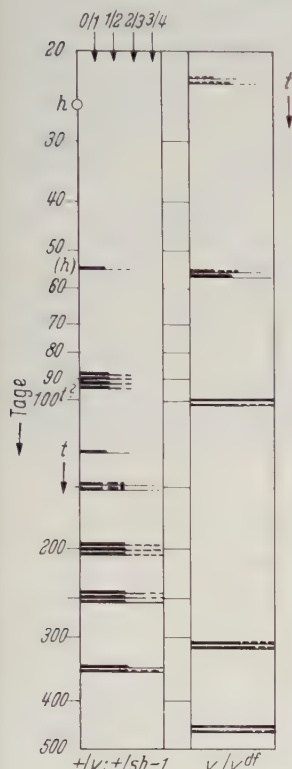


Abb. 13

Abb. 13. Die Degeneration der äußeren Haarzellen bei der Doppelheterozygoten $+/v; +/sh-1$ und beim Compound v/v^{df} . Das Alter ist logarithmisch aufgetragen. h = hört; (h) = schwerhörig; t = taub. Weitere Erklärungen s. Text zu Abb. 8

Abb. 14. Wucherung des Periosts in der Scala vestibuli einer > 450 Tage alten v^{df}/v^{df} -Maus. Halbwindungs-Übergang 1/2. Rechtes Ohr. Vergr. 175 × (D.)

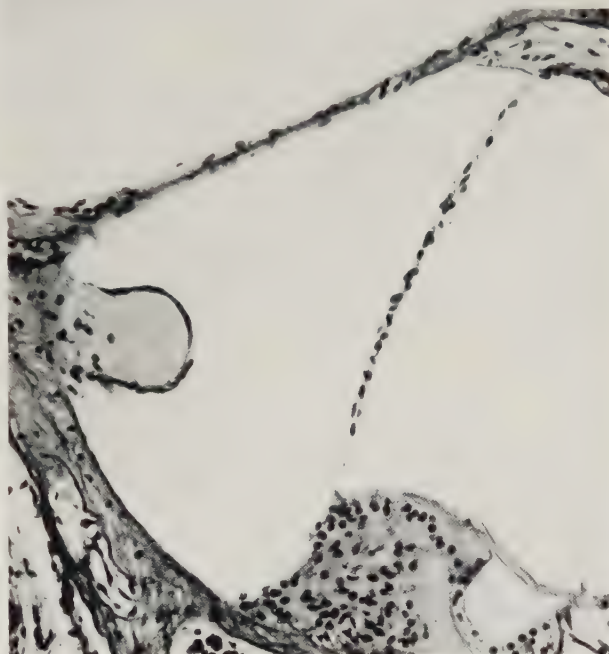


Abb. 14

Tier hat gleichzeitig ein von Otitis befallenes Mittelohr. Die Frage, ob die beiden Anomalien in diesem letzteren Fall in einem kausalen Zusammenhang miteinander stehen, muß offen bleiben.

b) Mittelohr. In allen vorliegenden Schnittserien ist auch ein mehr oder weniger großer Teil des Mittelohr-Hohlraums (in der Umgebung der Gehörknöchelchen) enthalten. Die große Mehrzahl der Mittelohren waren in dem von der Schnittserie erfaßten Teil normal und frei von Fremdmaterial. Jedoch wurden gelegentlich Anomalien in Form von Verschleimung, akuter Entzündung, mesenchymartiger Wucherungen und manchmal sogar Wucherungen knochenartigen Charakters gefunden. Von den meisten Tieren ist nur ein Ohr als Schnittpräparat vorhanden, so daß es nicht in jedem betroffenen Fall möglich ist, zu sagen, ob unilateraler oder bilateraler Befall vorliegt. Soweit bei betroffenen

Tabelle 7. *Vorkommen von Mittelohrstörungen im Gesamtuntersuchungsmaterial dieser Arbeit*

Der Zähler gibt jeweils die Zahl der Tiere mit Mittelohrstörungen, der Nenner die Gesamtzahl der untersuchten Tiere der betreffenden Gruppe an. T=Mutanten, N=Normale Kontrollen

	Altersgruppen (Tage)									
	0—14		15—20		21—100		101—300		> 300	
	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N
<i>dn</i>	1/11		0/1	0/1	0/7	0/1	0/5	0/1	1/19	1/4
<i>pdf</i>	0/6	0/1	0/1	0/1	0/4	0/3	0/5	0/3	0/4	0/2
<i>v</i>	0/3				0/2	0/1	0/6	0/1	1/1	
<i>pi</i>	0/5	0/2	0/1	0/1	0/4	0/3	0/5	0/2	1/2	
<i>je</i>	0/9	0/3	0/3	0/3	0/9	0/8	0/2		0/3	0/2
<i>sh-1</i>	0/1				1/2		1/3		0/2	
<i>sh-2</i>	3/11	0/1	0/2	0/2	0/9	0/9	0/4	0/2	0/1	
<i>Va</i> /+	0/11	1/11	0/3	0/3	0/10	0/10	0/2	0/2	0/1	0/1
<i>Va</i> / <i>Va</i>	0/1		0/3							
+/ <i>v</i> ; +/ <i>sh-1</i> . .					0/5		0/8		0/2	
<i>v</i> / <i>pdf</i>					0/6				0/2	

Tieren beide Ohren zur Verfügung standen, wurde ein bilateraler Befall festgestellt. Die Intensität konnte jedoch auf beiden Seiten verschieden sein. In der Zusammenstellung der Ergebnisse (Tabelle 7) ist nicht die Gesamtzahl der untersuchten oder betroffenen Ohren, sondern die Zahl der normalen oder betroffenen *Tiere* aufgeführt. Die Anomalien können in allen Altersgruppen, sowohl in Mutanten- als auch in normalen Kontroll-Ohren gefunden werden.

Bei der neugeborenen Maus ist der spätere Mittelohr-Hohlraum bis auf einen schmalen Spalt noch von lockerem Mesenchym ausgefüllt, die Eustachische Röhre ist jedoch bereits angelegt. Die Differenzierung des Cavum tympani erfolgt in den nächsten 14 Tagen unter Ab- oder Umbau dieses Mesenchyms. Bereits in dieser Altersgruppe wurden leichtere Infektionen mit starker Verschleimung gefunden. Bei akuter Entzündung in späteren Stadien ist die den Mittelohr-Hohlraum auskleidende Schleimhaut, das Periost der Gehörknöchelchen, die Membran des runden Fensters und das Trommelfell stark angeschwollen, das letztere ist nach innen gezogen und beeengt den Spielraum der Gehörknöchelchen (Abb. 16, Normalverhältnisse in Abb. 15). Auch wenn bindegewebsartige oder knochenartige Wucherungen im Cavum tympani vorhanden sind, ist eine Einziehung des Trommelfells und oft eine Verwachsung der Gehörknöchelchen mit der distalen oder proximalen Begrenzung des Mittelohrraumes zu beobachten. Ankylosis des Stapes oder seine Fixierung an der Arteria stapedia durch Fremdmaterial ist ebenfalls möglich. Bindegewebsartige Wucherungen, von knochenartiger Substanz erfüllte Regionen und Entzündungsherde können in ein und demselben Mittelohr vereinigt sein.

c) *Im Zusammenhang mit den Mittelohranomalien aufgetretene Anomalien des Innenohrs.* In einem 387 Tage alten Kontrolltier sind beide Mittelohren von akuter Otitis befallen; das ganze Cavum tympani ist voll von Granula. Im

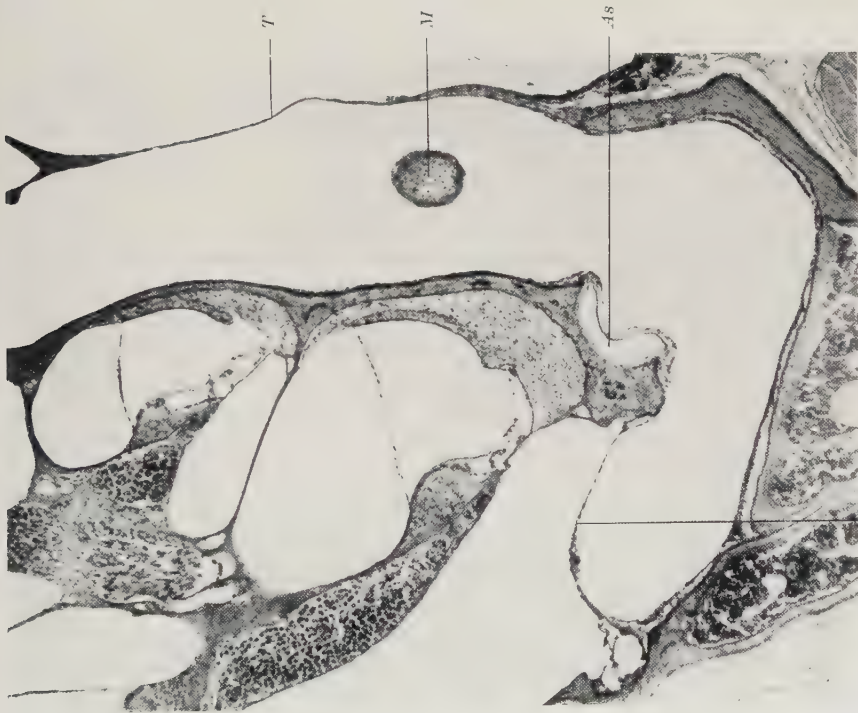


Abb. 15

Fr

Abb. 15. Schnitt durch ein normales Mittelohr einer 379 Tage alten *+ / da*-Maus. *T* = Trommelfell; *M* = Membran des runden Fensters. Linkes Ohr. Vergr. 60 \times



Abb. 16

Fr

Abb. 16. Schnitt durch ein entzündetes Mittelohr einer 387 Tage alten *+ / da*-Maus. Bezeichnungen s. Abb. 15. Linkes Ohr. Vergr. 51 \times

rechten Ohr ist das Cortische Organ basal degeneriert: der äußere Tunnel fehlt bis in die Mittelwindung, in der ersten Windung fehlen die Haarzellen. Der Querschnitt der Stria vascularis ist basal beträchtlich reduziert, das Spiralganglion ausgedünnt (Abb. 1, 2, 3). Im linken Ohr, wo die Mittelohrentzündung gleich stark ist, weist der Scala media-Komplex nur in der ersten Halbwindung leichte Anomalien auf.

Während im vorhergehenden Fall eine normale Balance des Endo- und Perilymphdruckes herrscht, ist die Scala media einer über 450 Tage alten *pi/pi*-Maus, deren Innenohr ganz von einem Gemisch von Entzündungsherden und mesenchym- und knochenartigen Wucherungen erfüllt ist, in der gleichen Weise degeneriert wie der Degenerations-Typus 2 des *M^{mh}*-Stammes (Kocher 1960): der Endolymphraum ist stark reduziert, die Deckmembran aufgequollen und die Reste des Cortischen Organs sind größtenteils von der Basilarmembran abgehoben. Der Sacculus weist die typische „Sandwichsituation“ auf, d. h. er ist kollabiert und die Otolithen sind von der Macula abgehoben und in die membranöse Innenwand eingeschlossen (Kocher 1960, Abb. 12). Keiner der im Material dieser Arbeit sonst noch vorhandenen Sacculi zeigte diese Abnormität (von normalen Kontrollen liegen 65 und von Mutantenohren 142 normalumige Sacculi vor: 2 Sacculi weisen Minoranomalien, ein weiterer eine Aufblähung im Zusammenhang mit einer Vergrößerung des Endolymphraumes der Cochlea auf).

Diskussion

Allelie und Kombinanzeffekte. Die Zahl der Rückkreuzungstiere (Total 379) beim Allelietest von *v* und *v^{df}* ist nicht sehr groß; so ist die Möglichkeit einer engen Koppelung zwischen den beiden Genen vorläufig erst auf einen Austauschwert von 1,6% eingengt. Es scheint aber gerechtfertigt, eine Alleliebeziehung zwischen *v* und *v^{df}* anzunehmen, da das physiologische Verhalten des Compounds *v/v^{df}* mit dem der Homozygoten *v^{df/v^{df}}* übereinstimmt: die anfänglichen Hörperioden decken sich.

Bis auf *dn* sind nun alle hier bearbeiteten Labyrinthmutanten lokalisiert. Wie die Hörteste an Kombinationen einfach dosierter Gene zeigten, ist *dn* nicht allel zu einer der rezessiven Taubheitsmutanten der *deaf-waltzer-shaker*-Gruppe. Ein Allelietest mit *Va* steht noch aus.

Die Kombinanzeffekte der Gene *v* und *sh-1*, sowie *v^{df}* und *sh-1* in Doppelheterozygoten äußerten sich in einem relativ späten Ertauben. Außerdem bestand ein beträchtlicher Unterschied im Zeitpunkt des Ertaubens sowohl (1) zwischen den von Lord und Gates (1929) und Deol (1956a) beschriebenen Doppelheterozygoten *+v; +sh-1* einerseits und den von mir untersuchten Tieren gleicher Konstitution andererseits, als auch (2) zwischen den Doppelheterozygoten *+v^{df}; -sh-1* meiner ersten und zweiten Untersuchung (Tabelle 8). Im ersten Fall führte nur die Tatsache, daß ein Kombinanzeffekt bereits beschrieben war, zur Beobachtung des Ertaubens, im zweiten Fall die aus der Aufdeckung der Allelie von *v* und *v^{df}* folgende Überlegung. Daher ist es nicht ausgeschlossen, daß außer den beiden festgestellten Fällen von Zusammenwirken rezessiver Gene in einfacher Dosis innerhalb der *deaf-waltzer-shaker*-Gruppe noch weitere solcher Beispiele von spät ertaubenden Doppelheterozygoten zu finden wären, wenn die Haltungsdauer der Tiere über 6 Monate ausgedehnt würde.

Die am Compound *v^{df}* gemachte Beobachtung, daß Anfang *und* Ende der Hörperiode vom allgemeinen Entwicklungszustand der Tiere abhängt, zeigt, daß nicht nur der Zeitpunkt des Einsetzens normaler Organfunktionen vom allgemeinen Reifezustand des Organismus abhängt, sondern daß das gleiche auch für genbedingte Funktionsausfälle gilt. Das mutierte Gen ist somit kein Uhrwerk, das in einem bestimmten Zeitpunkt die normale Koordination der Entwicklungsvorgänge stört, sondern es ist in seiner Auswirkung von einem spezifischen Reifungsgrad des betreffenden Organs abhängig.

Tabelle 8. Zeitpunkt des Ertaubens der genetischen Konstitutionen, bei welchen Hörperioden festgestellt wurden

Wo mehrere Autoren den gleichen Befund erhielten, ist die Zusammenfassung von GRÜNEBERG 1956a eingesetzt. Einzelfälle, die später ertaubten als der allgemeine Durchschnitt, stehen in Klammern.

Genetische Konstitution	Autor	Jahr	Zeitpunkt des Ertaubens
<i>v^{df}/v^{df}</i>	DEOL KOCHER	1956b 1960	taub vom Beginn (2.—3. Monat) 16.—25. Tag
<i>v^{df}/v</i>	KOCHER	1960	16.—25. Tag
<i>v/v</i>	YERKES GRÜNEBERG KOCHER	1907 1956a 1960	15.—19. Tag oder taub vom Beginn } taub vom Beginn
<i>sh-1/sh-1</i>	LORD and GATES DEOL KOCHER	1929 1956a 1960	22.—30. Tag 4.—8. Woche 5.—6. Woche
<i>pi/pi</i>	GRÜNEBERG KOCHER	1956a 1960	taub vom Beginn 2.—4. Monat
<i>+v; +sh-1</i>	LORD and GATES DEOL KOCHER	1929 1956a 1960	3.—4. Monat oder älter nach 10. Woche (5. oder 6. Monat) 16.—> 21. Monat
<i>+v^{df}; +sh-1</i>	KOCHER	1960	> 9. Monat 3.—6. Monat oder älter

Hörperioden bei Homozygoten (Tabelle 8). Auch die Beobachtungen von anfänglichen Hörperioden bei Homozygoten zeigen, daß der Zeitpunkt des Ertaubens einer bestimmten Genkonstitution verschieden sein kann bei Würfen, die gleichzeitig oder zu verschiedenen Zeitpunkten in einem Stamm getestet wurden und daß beträchtliche Unterschiede bestehen können in den Befunden, die zu verschiedenen Zeiten, von verschiedenen Beobachtern, an verschiedenen Stämmen einer Mutante erhoben wurden.

So war nach DEOL (1956b) *v^{df}* von Anfang an taub, während ich im Material des gleichen Stammes 2 Jahre später regelmäßig eine kurze anfängliche Hörperiode beobachtete. Allerdings hatte DEOL bereits 2 Ausnahmefälle mit anfänglicher Hörperiode erwähnt. Der *v^{df}*-Stamm war in der Zwischenzeit einmal nach dem Inzuchtstamm CBA/Gr ausgekreuzt worden. Eine weitere Auskreuzung des Stammes nach *Grey-lethal* beeinträchtigte die Hörperiode nicht. Bei *pirouette* beschrieben sowohl WOOLLEY und DICKIE (1945) wie auch DEOL (1956a) ebenfalls keine anfängliche Hörperiode. Ich fand eine solche einige Jahre später im bereits von DEOL geführten Stamm, der inzwischen nach CBA ausgekreuzt worden war. Andererseits bestehen hinsichtlich der Beobachtungen der anfänglichen Hörperiode bei *shaker-1* keine wesentlichen Unterschiede zwischen den DEOLschen und meinen eigenen Befunden, obwohl der Stamm seit DEOLs Untersuchung einmal nach CBA und später nach

Grey-lethal ausgekreuzt worden war. Dagegen hatten LORD und GATES (1929) ein bedeutend früheres Ertauben bei *shaker-1* festgestellt. Die kurze Hörperiode, die YERKES (1907) bei einigen *waltzen* fand, konnte ich an meinem Material nicht bestätigen.

Das „Hör“-Prüfverfahren bestand bei allen aufgeführten Arbeiten in der Beobachtung unbedingter Reflexe. Unterschiede in der Qualität und Länge des Reiztones, in der Art der Beobachtung und in der Position des Versuchstieres (im Zuchtkasten sitzend oder festgehalten) können teilweise zu Verschiedenheit der Befunde geführt haben. Viel weitgehender dürften die Differenzen jedoch auf das verschiedene *genotypische Milieu* zurückzuführen sein, in dem sich die Gene oder Genkombinationen, die zum Ertauben führten, im Zeitraum der Untersuchung befanden.

Anatomische Befunde. Über die Ätiologie des *waltzer-shaker*-Syndroms, bzw. der unkomplizierten Taubheit, kann nichts Definitives ausgesagt werden, solange vergleichende Untersuchungen am Zentralnervensystem fehlen. Die anatomischen Befunde der vorliegenden Arbeit sind daher vorläufig lediglich als Aufschlüsse über den Zeitpunkt des Einsetzens und den Verlauf der Degeneration der 3 Komponenten des Scala media-Komplexes verwertbar. Da nur die mikroskopisch-anatomischen Veränderungen der Mutanten untersucht wurden, ist noch mit der Möglichkeit zu rechnen, daß chemische oder submikroskopische Untersuchungen etwas früher einsetzende Veränderungen der degenerierenden Strukturen zutage fördern könnten.

Die Untersuchungen von DEOL und DEOL und KOCHER konzentrierten sich vor allem auf die Beschreibung der pathologischen Veränderungen in der Mittelwindung (Übergang der Halbwindungen 2/3) der Cochlea, da sich im modiolär orientierten Schnittpräparat die Strukturen der Scala media im allgemeinen dort am besten repräsentieren. Sowohl normale Differenzierung wie auch pathologische Degeneration der Cochlea verlaufen jedoch in einer basal-apikalen Entwicklungsfolge. Somit war es wünschenswert, die *Dynamik* dieses Verlaufes zu erfassen. Voraussetzung hierfür war ein methodisch einheitliches *quantitatives* Erfassen der Degeneration der 3 Komponenten des Scala media-Komplexes in der *gesamten* Cochlea.

Die normale Differenzierung der Cochlea scheint streng basal-apikal zu verlaufen (s. z. B. WEIBEL 1957). Dies gilt auch sicher für die Degenerationsfolge der äußeren Haarzellen des Cortischen Organs aller *deaf-waltzer-shaker*-Mutanten. Auch für die Reduktion der Stria vascularis der Mutanten konnte dieses Verhalten zwischen den Übergängen 1/2 und 2/3, auf die sich die Untersuchung beschränkte, nachgewiesen werden. Dagegen zeigt das Spiralganglion nicht in allen Fällen einen gleichmäßigen apikal-basalen Abfall der Ganglienzell-Konzentration. Am deutlichsten tritt dies bei *Va* zutage (Wannenform des Zelldichte-Profils), aber auch in einigen fortgeschrittenen Einzelfällen anderer Mutanten ist im apikalen Bereich eine Umkehr des Gefälles zu beobachten.

Die äußere Haarzellreihe ist diejenige Komponente des Scala media-Komplexes, die hinsichtlich der Geschwindigkeit des Degenerationsablaufs am straffsten mit dem Abnehmen der Hörfähigkeit der verschiedenen genetischen Konstitutionen verknüpft ist. Da die Haarzellen die rezipierenden Endpunkte der Reizleitung darstellen, leuchtet dieser Zusammenhang zwischen ihrem Degenerationsverlauf und dem physiologischen Verhalten der Mutanten ein.

Der Beginn der morphologischen Veränderungen der Scala media-Komponenten ist bei *allen* hier bearbeiteten rezessiven *deaf-waltzer-shaker*-Mutanten eindeutig *zeitlich gestuft*: zuerst bleibt die Querschnittsfläche der Stria vascularis im basalen Teil der Schnecke hinter dem Normalwert zurück, dann beginnen dort die Haarzellen des Cortischen Organs zu degenerieren und später kommt es zur Degeneration des Spiralganglions (s. Tabelle 9). *Va* scheint dagegen außer seiner genetischen Sonderstellung (Semidominanz) auch eine morphologische Sonderstellung einzunehmen: die totale Degeneration der Haarzellen erfolgt sowohl bei *Va/+* als auch bei *Va/Va* viel rascher. Das Spiralganglion weist einen im Zelldichteprofil und in der Geschwindigkeit anderen Degenerationsmodus auf als die rezessiven Mutanten; seine Degeneration geht derjenigen der Haarzellen voraus. Bei *Va/Va* ist zudem die Degeneration der Stria vascularis in frühen Stadien schon bedeutend stärker als bei *Va/+* und den rezessiven Mutanten (Tabelle 3 und 4).

Die Unterschiede zwischen Tabelle 9 und DEOLs Ergebnissen (1956a, Tabelle 1, 1956b, DEOL and KOCHER 1958) erklären sich vor allem daraus, daß DEOL sich bei der Untersuchung der Cochlea auf die Mittelwindung konzentrierte und damit nicht das *Einsetzen* der Degeneration, sondern lediglich das *Erfastwerden dieses Schneckenabschnittes* von der Degeneration beobachtete. Besonders drastisch ist der Unterschied bezüglich des Degenerationsbeginns der Stria vascularis, der nach DEOL bei *v^{df}* am 26. Tag post partum, bei *Va*, *sh-2* und *je* in der 3. Woche p. p. und bei *sh-1*, *v* und *pi* sogar später als 2 Monate p. p. liegt. So schien die Degeneration der Haarzellen den pathologischen Veränderungen der Stria vorauszugehen und damit fand sich DEOL in Widerspruch zu den Befunden und Hypothesen von VAN LENNEP (1910) und GRÜNEBERG, HALLPIKE und LEDOUX (1940). Nach diesen Autoren waren die Veränderungen der Stria vascularis das Primäre und die Degeneration von Haar- und Ganglienzellen deren Folge: die Endolympe, die von der Stria produziert werden soll, sollte die Ernährung des Cortischen Organs nicht mehr in genügendem Maß bewältigen können.

Die Frage, ob die Stria vascularis das Produktionsorgan der Endolympe sei, ist immer noch umstritten:

Tabelle 9. Zeitpunkte des Einsetzens und der Beendigung, bzw. deutlichen Ausprägung der Degeneration der Komponenten des Scala media-Komplexes der *deaf-waltzer-shaker*-Mutanten (Tage)

Eingeklammerte Zahlen: für präzise Angaben fehlen Vor- bzw. Zwischenstadien. Der Beginn der Stria-Degeneration dürfte bei <i>sh-1/sh-1</i> (nach Extrapolation der vom 21. Tag an vorhandenen Werte) wie bei den übrigen Mutanten zwischen dem 3. und 10. Tag liegen		<i>cdt/cdt</i>	<i>dn/dn</i>	<i>pi/pi</i>	<i>v/v</i>	<i>je/je</i>	<i>sh-1/sh-1</i>	<i>sh-2/sh-2</i>	<i>Va/+</i>	<i>Va/Va</i>
Einsetzen der Degeneration	Stria vascularis (Halbwindung 1/2)	3—10	3—10	3—10	3—10	3—10	3—10 ?	3—10	3—10	(3 ?)
	Haarzellen	(11)—14	11—12	12—13	(8)—13	11—12	(21 ?)	13—15	11—13	?
Alles degeneriert Deutlich degeneriert	Spiralganglion	14—302	11—21	(40—75)	(27—122)	15—122	(21 ?)	25—60	9	(12 ?)
	Haarzellen	> 450	> 200	> 200	> 200	> 200	> 100	> 200	> 60	(> 60)
	Spiralganglion	> 300	> 35	> 109	(> 122)	122—243	67—147	> 95	> 11	(12)

neuerdings sprechen sich z. B. TÖNDURY (1954) und WEIBEL (1957) für eine Endolymphproduktion der Stria, HERTWIG (1956) und FISCHER (1956, 1957) gegen eine solche aus. Diese Ansichten stützen sich auf die Untersuchung der Normalentwicklung des Innenohres der Maus (WEIBEL), der degenerativen Veränderungen des menschlichen Ductus cochlearis bei Rubeolenerkrankung der Mutter (TÖNDURY) und der Entwicklung von Kreislern, syndaktylen Schüttlern und Drehern bei der Maus (HERTWIG und FISCHER). Bei diesen virus- und genbedingten Anomalien war das Gleichgewicht zwischen den endo- und perilymphatischen Räumen gestört.

Für die vorliegenden *deaf-waltershaker*-Mutanten, bei welchen der Endolymphraum weder eine Verringerung noch eine Ausdehnung erleidet, steht nicht die Frage nach der Endolymphproduktion, sondern die Frage nach der *Ernährungsfunktion* der Stria im Vordergrund. Eine solche ist auch ohne einen direkten Beweis auf Grund des ausgedehnten Kapillarnetzes als höchst wahrscheinlich anzunehmen (s. auch TÖNDURY 1952, 1954, WEIBEL 1957). Ist die Stria vascularis lediglich ein Diffusionsorgan für nutritive Bestandteile des Blutes oder ein sekretorisches Umwandlungsorgan für dieselben oder erfüllt sie beide Funktionen? WEIBEL (1957) erwähnt morphologische und experimentelle Befunde, die für eine sekretorische Tätigkeit der Stria sprechen. Es wäre möglich, daß bei der Degeneration der Stria eine solche sekretorische Tätigkeit ganz oder teilweise ausfiel und daß durch Diffusion noch ein — allerdings für die Gesunderhaltung des Cortischen Organs nicht mehr ausreichender — Teil der Ernährung gewährleistet bliebe. Die Voraussetzung für eine solche Annahme wäre bei der *deaf-waltzer-shaker*-Gruppe insofern gegeben, als das Muster des Kapillarnetzes der Mutantenstria auch bei weitgehender Reduktion ihrer Querschnittsfläche im wesentlichen erhalten bleibt. Die Befunde von v. FIEANDT und SAXÉN (1937, s. auch SAXÉN 1951) eröffnen einen anderen Gesichtspunkt: diese Autoren glauben auf Grund mikroskopischer Untersuchungen, daß sowohl die Stria vascularis wie auch das auf der Konvexität der Prominentia spiralis vorhandene Epithel sekretorisch tätig ist. Die Sekretion der Prominentia soll sogar lebhafter und kontinuierlicher sein als die der Stria. Bei den *deaf-waltzer-shaker*-Mutanten bildet sich die Prominentia spiralis nicht zurück (s. Abb. 4). Es wäre also denkbar, daß sie eine subnormale Ernährung noch aufrecht erhielte, während die Ernährungsfunktion der Stria mit ihrer Degeneration teilweise oder ganz ausfiel, worauf das anspruchsvolle Sinnesepithel degenerativ anspräche.

Reduziert sich der Querschnitt der Mutantenstria infolge (quantitativ oder qualitativ) ungenügender Blutzufuhr zu ihrem Kapillarsystem oder degenerieren die Striazellen unabhängig von der Blutversorgung? Auch diese Frage muß vorläufig noch offen bleiben.

Die beiden im Material dieser Arbeit zusammen mit Mittelohrentzündungen aufgetretenen atypischen Anomalien des Innenohrs (die basale Degeneration eines genetisch normalen Kontrollohrs, sowie die atypischen Veränderungen in der Scala media einer *pi/pi*-Maus) sind als Folgen der Mittelohrerkrankung aufzufassen. In einer Arbeit über spät entstehende Taubheit (KOCHER 1960) im C57BL/Gr-Inzuchtstamm und im *Mi^{wh}*-Stamm soll die Beziehung von Mittelohranomalien und Veränderungen im Innenohr diskutiert werden. Die hier gefundenen beiden Fälle werden hierfür aufschlußreich sein.

Summary

1. The mutants „*df*“, *dn*, *sh-1*, *sh-2*, *pi*, *je*, *v* and *Va* (*deaf-waltzer-shaker* group) which affect the otic labyrinth in the mouse have been investigated with regard to allelism, physiological interaction in double heterozygotes and effects on hearing ability during development. In addition, the histological changes occurring during development of the scala media-complex have been compared in these mutants and their intercrosses, using quantitative criteria.

2. The gene for uncomplicated deafness „*df*“ and the *waltzer*-gene *v* are alleles. The symbol *df* should therefore be replaced by *v^{df}*. A test for allelism showed that these genes are not at separate, linked loci with a recombination fraction $> 1.6\%$.

3. Both *v^{df}/v^{df}* and *v/v^{df}* individuals can hear for a period of some days before weaning.

4. The initial hearing period of *sh-1/sh-1* mice has been confirmed. In addition, an initial period of hearing of 1 to 4 months has been found in *pi/pi* individuals.

5. Not only the double heterozygote *+/v; +/sh-1*, but also the double heterozygote *+/v^{df}; +/sh-1* becomes deaf at a late stage. All the remaining double heterozygotes of the recessive genes investigated have been found to hear normally for at least 6 months.

6. The mode of degeneration of the stria vascularis is the same in all homozygotes of the recessive genes and in *Va/+*, *+/v; +/sh-1* and *v/v^{df}*: whereas in normal controls the cross sectional area of the stria in the basal and middle half turn of the cochlear duct increases until about the 20th day post partum and then remains constant, in genetically deaf animals it is already reduced basally from the time when the outline of the stria becomes well-defined (i. e. the 3rd day p. p.). Subsequently it undergoes increasing reduction. In the middle half turn of the cochlear duct of the mutant ears the cross sectional area increases until the 10th day p. p., but afterwards it also decreases. In *Va/Va* the degeneration of the stria vascularis is more marked from the beginning of its appearance.

7. The degeneration of the outer hair cells in the organ of Corti begins basally at the end of the second week p. p. and proceeds towards the apex. It proceeds with different velocities in the different mutants (and combinations of genes which lead to deafness): in mutants with an initial period of hearing the hair cells remain normal in the apical part of the cochlea for a longer time than in mutants which are deaf from the beginning.

8. The spiral ganglion may show a slight loss of ganglionic cells in *Va/+* at the beginning, and in the recessive mutants at the end of the second week p. p.. A more significant thinning out of the content of Rosenthal's canal, however, is found considerably later (with the exception of *Va/+* and *Va/Va*). Each mutant has a distinctive mode of degeneration of the spiral ganglion.

9. Anomalies in the middle and inner ear which were found occasionally and which are not due to genetic factors are described.

Literatur

- DEOL, M. S.: The anomalies of the labyrinth of the mutants Varitint-waddler, shaker-2 and jerker in the mouse. J. Genet. **52**, 562—588 (1954).
 DEOL, M. S.: The anatomy and development of the mutants pirouette, shaker-1 and waltzer in the mouse. Proc. roy. Soc. B **145**, 206—213 (1956).

- DEOL, M. S.: A gene for uncomplicated deafness in the mouse. *J. Embryol. exp. Morph.* **4**, 190—195 (1956).
- DEOL, M. S., and W. KOCHER: A new gene for deafness in the mouse. *Heredity* **12**, 463—466 (1958).
- FIEANDT, H. v., u. A. SAXÉN: Beiträge zur Histologie der Stria vascularis und der Prominentia spiralis bei Säugern (Hund und Mensch). *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **106**, 424—446 (1937).
- FISCHER, H.: Morphologische und mikroskopisch-anatomische Untersuchungen am Innenohr eines Stammes spontanmutierter Hausmäuse (Dreher). *Z. mikr.-anat. Forsch.* **62**, 348—406 (1956).
- FISCHER, H.: Untersuchungen am Innenohr einer bewegungsgestörten, tauben Hausmausmutante im Vergleich mit der vererbbaaren, labyrinthären Hörstörung des Menschen. *Arch. Ohr-, Nas.- u. Kehl.-Heilk.* **170**, 411—433 (1957).
- GREEN, M. C., and M. M. DICKIE: Linkage map of the mouse. *J. Hered.* **50**, 2—5 (1959).
- GRÜNEBERG, H.: *The Genetics of the Mouse*, 2nd ed. The Hague: Martinus Nijhoff 1952.
- GRÜNEBERG, H.: Hereditary lesions of the labyrinth in the mouse. *Brit. med. Bull.* **12**, 153—157 (1956).
- GRÜNEBERG, H.: An annotated catalogue of the mutant genes of the house mouse. Medical Research Council Memorandum No 33. London: Her Majesty's Stationery Office 1956.
- GRÜNEBERG, H., C. S. HALLPIKE and A. LEDOUX: Observations on the structure, development and electrical reactions of the internal ear of the shaker-1 mouse (*Mus musculus*). *Proc. roy. Soc. B* **129**, 154—173 (1940).
- HADORN, E.: *Letalfaktoren*. Stuttgart: Thieme 1955.
- HERTWIG, P.: Erbliche Mißbildungen des Gehörorgans bei der Maus. *Verh. anat. Ges. (Jena)* **53**, 256—269 (1956).
- KOCHER, W.: Untersuchungen zur Genetik und Pathologie der Entwicklung spät einsetzender hereditärer Taubheit bei der Maus (*Mus musculus*). *Arch. Ohr-, Nas.- u. Kehl.-Heilk.* (1960). Im Druck.
- LENNEP, E. C. C. VAN: Het verloop der afwijkingen in het gehoororgaan van de Japansche dansmuis. *Med. Diss. Utrecht* 1910, pp. 82.
- LORD, E. M., and W. H. GATES: Shaker, a new mutant of the house mouse (*Mus musculus*). *Amer. Naturalist* **63**, 435—442 (1929).
- SAXÉN, A.: Histological studies of endolymph secretion and resorption in the inner ear. *Acta oto-laryng. (Stockh.)* **40**, 23—31 (1951).
- TÖNDURY, G.: Zur Wirkung des Erregers der Rubeolen auf den menschlichen Keimling. *Helv. paediat. Acta* **7**, 105—135 (1952).
- TÖNDURY, G.: Zur Kenntnis der Embryopathien. Die Wirkung des Erregers der Rubeolen und anderer Viren auf den menschlichen Keimling. *Ciba-Symposium* **2**, 138—157 (1954).
- WEIBEL, E. R.: Zur Kenntnis der Differenzierungsvorgänge im Epithel des Ductus cochlearis. *Acta anat. (Basel)* **29**, 53—90 (1957).
- WOOLLEY, G. W., and M. M. DICKIE: Pirouetting mice. *J. Hered.* **36**, 281—284 (1945).
- YERKES, R. M.: *The dancing mouse*. A study in animal behaviour. The Animal Behaviour Series, Vol. I. New York: Macmillan Company 1907.